

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 11 May 2000 (11.05.00)	
International application No.: PCT/JP99/05964	Applicant's or agent's file reference: 661516
International filing date: 28 October 1999 (28.10.99)	Priority date: 30 October 1998 (30.10.98)
Applicant: KONDO, Akihiro et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
14 March 2000 (14.03.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 661516	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/05964	International filing date (day/month/year) 28 October 1999 (28.10.99)	Priority date (day/month/year) 30 October 1998 (30.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68, C12N 15/12, C12M 1/00, G01N 33/566, 33/53		
Applicant TAKARA SHUZO CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 14 March 2000 (14.03.00)	Date of completion of this report 05 December 2000 (05.12.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05964

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05964

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-9	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1-9

Document 1: US, 5445934, A (Affymax Technologies N.V.), 8 October, 1992 (08.10.92), & JP, 4-505763, A, & EP, 476014, A
describes a method of detecting an intended gene by means of hybridization using a DNA array.

Document 2: Amy Hoffer et al., "Dioxin Induces Transcription of fos and jun Genes by Ah Receptor-Dependent and -Independent Pathways," Toxicology and Applied Pharmacology (1996), Vol. 141, pages 238-247
describes a gene affected by a dioxin that is an endocrine disruptor.

Document 3: Fujio Kayama, "What is the environmental hormone issue? (in Japanese)," Chemistry, Vol. 53 (July 1998), pages 12-15
describes various endocrine disruptors together with their actions.

So, a person skilled in the art could have easily conceived of detecting a gene affected by an endocrine disruptor, by means of hybridization using a DNA array, based on the descriptions of documents 1-3.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

15T

特 許 協 力 条 約

REC'D 26 JAN 2001

WIPO PCT

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
(PCT36条及びPCT規則70)

出願人又は代理人 の書類記号 661516	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/05964	国際出願日 (日.月.年) 28. 10. 99	優先日 (日.月.年) 30. 10. 98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ¹ C12Q1/68, C12N15/12, C12M1/00, G01N33/566, G01N33/53		
出願人 (氏名又は名称) 資酒造株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎

II ☐ 優先権

III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

IV ☐ 発明の単一性の欠如

V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 14. 03. 00	国際予備審査報告を作成した日 05. 12. 00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 加藤 浩 印	4 B 9050
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-9	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-9	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-9	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1-9

文献1: US, 5445934, A (アフィマックス テクノロジー ナームロゼ ベノート スハツブ) 8.10月.1992(08.10.92) & JP, 4-505763, A & EP, 476014, A
には、DNAアレイを用いたハイブリダイゼーション法により、目的遺伝子を検出する方法が記載されている。

文献2: Amy Hoffer et al. "Dioxin Induces Transcription of fos and jun Genes by Ah Receptor-Dependent and -Independent Pathways" Toxicology and Applied Pharmacology (1996) 第141巻 p. 238-247
には、内分泌かく乱物質であるダイオキシンの影響を受ける遺伝子について記載されている。

文献3: 香山不二雄著 「環境ホルモン問題とは何か」化学, 第53巻 (7月.1998) p. 12-15
には、種々の内分泌かく乱物質が、その作用とともに記載されている。

してみれば、文献1～文献3の記載に基づき、内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子を、DNAアレイを用いたハイブリダイゼーション法により検出することは、当業者が容易になし得ることと認められる。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A.D

特 許 協 力 条 約

PCT

EP



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 661516	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/05964	国際出願日 (日.月.年) 28.10.99	優先日 (日.月.年) 30.10.98
出願人(氏名又は名称) 寶酒造株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)



(51) 国際特許分類7 C12Q 1/68, C12N 15/12, C12M 1/00, G01N 33/566, 33/53	A1	(11) 国際公開番号 WO00/26404 (43) 国際公開日 2000年5月11日(11.05.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05964 (22) 国際出願日 1999年10月28日(28.10.99) (30) 優先権データ 特願平10/310285 1998年10月30日(30.10.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 資酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 近藤昭宏(KONDO, Akihiro)(JP/JP) 〒525-0025 滋賀県草津市西渋川2丁目12-1 ハーモバレス草津101号 Shiga, (JP) 佐川裕章(SAGAWA, Hiroaki)(JP/JP) 〒525-0025 滋賀県草津市西渋川2丁目12-1 ハーモバレス草津503号 Shiga, (JP) 峰野純一(MINENO, Junichi)(JP/JP) 〒611-0002 京都府宇治市木幡南山115-78 Kyoto, (JP) 君塚房夫(KIMIZUKA, Fusao)(JP/JP) 〒523-0056 滋賀県近江八幡市古川町1500-20 Shiga, (JP)		加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)(JP/JP) 〒611-0028 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP) (74) 代理人 青山 蓀, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP) (81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: METHOD FOR DETECTING GENE AFFECTED BY ENDOCRINE DISRUPTOR		
(54)発明の名称 内分泌かく乱物質によって影響を受ける遺伝子の検出方法		
(57) Abstract		
<p>A method for detecting a gene affected by an endocrine disruptor characterized by comprising preparing a nucleic acid sample containing mRNAs originating in cells, tissues or organisms, which have been brought into contact with a sample containing the endocrine disruptor, or cDNAs thereof; hybridizing the nucleic acid sample with DNA alleys wherein genes which might be affected by the endocrine disruptor or DNA fragments originating in these genes have been fixed; and then comparing the thus obtained results with the results obtained by using another nucleic acid sample originating in a comparative sample to thereby select the gene affected by the endocrine disruptor.</p>		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05964

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/12, C12M1/00, G01N33/566, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/12, C12M1/00, G01N33/566, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEW, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, 5445934, A (Affymax Technologies N.V.), 08 October, 1992 (08.10.92) & JP, 4-505763, A & EP, 476014, A	1-9
Y	Amy Hoffer et al., "Dioxin Induces Transcription of fos and jun Genes by Ah Receptor-Dependent and -Independent Pathways" Toxicology and Applied Pharmacology (1996), Vol. 141, p. 238-247	1-9
Y	Fujio Kayama, "What is the environmental hormone problem?" (in Japanese), Chemistry, Vol. 53, July 1998, p. 12-15	1-9
A	US, 5496703, A (Cornell Research Foundation Inc.), 23 February, 1995 (23.02.95) & JP, 7-501883, A & EP, 614530, A	1-9
A	US, 4798807, A (The Regents of the University of California), 21 January, 1988 (21.01.88) & JP, 63-014691, A & EP, 251635, A	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
25 January, 2000 (25.01.00)Date of mailing of the international search report
15 February, 2000 (15.02.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



PCT

特許協定条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12Q 1/68, C12N 15/12, C12M 1/00, G01N 33/566, 33/53</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/26404</p> <p>(43) 国際公開日 2000年5月11日(11.05.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05964</p> <p>(22) 国際出願日 1999年10月28日(28.10.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/310285 1998年10月30日(30.10.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 資酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 近藤昭宏(KONDO, Akihiro)(JP/JP) 〒525-0025 滋賀県草津市西渋川2丁目12-1 ハーモパレス草津101号 Shiga, (JP) 佐川裕章(SAGAWA, Hiroaki)(JP/JP) 〒525-0025 滋賀県草津市西渋川2丁目12-1 ハーモパレス草津503号 Shiga, (JP) 峰野純一(MINENO, Junichi)(JP/JP) 〒611-0002 京都府宇治市木幡南山15-78 Kyoto, (JP) 君塚房夫(KIMIZUKA, Fusao)(JP/JP) 〒523-0056 滋賀県近江八幡市古川町1500-20 Shiga, (JP)</p>	<p>加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)(JP/JP) 〒611-0028 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: METHOD FOR DETECTING GENE AFFECTED BY ENDOCRINE DISRUPTOR</p> <p>(54)発明の名称 内分泌かく乱物質によって影響を受ける遺伝子の検出方法</p> <p>(57) Abstract A method for detecting a gene affected by an endocrine disruptor characterized by comprising preparing a nucleic acid sample containing mRNAs originating in cells, tissues or organisms, which have been brought into contact with a sample containing the endocrine disruptor, or cDNAs thereof; hybridizing the nucleic acid sample with DNA alleys wherein genes which might be affected by the endocrine disruptor or DNA fragments originating in these genes have been fixed; and then comparing the thus obtained results with the results obtained by using another nucleic acid sample originating in a comparative sample to thereby select the gene affected by the endocrine disruptor.</p>		

(57)要約

内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子を検出する方法であって、内分泌かく乱物質を含む試料と接触させた細胞、組織または生物体由来のmRNAまたはそのcDNAを含む核酸試料を調製し、該核酸試料を内分泌かく乱物質の影響を受ける可能性のある遺伝子もしくは該遺伝子由来のDNA断片が固定されたDNAアレイとハイブリダイズさせ、その結果を対照試料由来の核酸試料を用いたものと比較して内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子を選択することを特徴とする遺伝子の検出方法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロバキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャド
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CN	中国	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KR	韓国	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

明 細 書

内分泌かく乱物質によって影響を受ける遺伝子の検出方法

5 技術分野

本発明は、生体の恒常性に影響をおよぼす内分泌かく乱物質、及び該物質の影響を受ける遺伝子の検出方法に関する。

背景技術

- 10 内分泌かく乱物質は、しばしば環境ホルモンともよばれており、環境中に放出された化学物質のうちホルモン類似作用あるいは抗ホルモン作用が見出されたものを総称して言う。野生動物の生態系への影響としては、生殖能の変化、特に雄の雌化、生殖能の低下、ふ化率の低下、子の生存率の低下、生殖行動の異常等が報告されている。また、ヒトの健康への影響としては、精子数の減少、子宮内膜
- 15 症、不妊、卵巣ガン、子宮ガン、前立腺ガン等が疑われているが、証明はされていない。

- 内分泌かく乱を引き起こすと考えられている物質（群）については、環境庁の「外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班」１９９７年７月の中間報告において報告されている。しかしながら、こうした物質は、今後の調査・研究の過程でさらに増えていくことが予想されている。
- 20

- 一方、内分泌かく乱物質の測定法としては、インビトロとインビボの２通りの方法が知られており、前者では、エストロゲンレセプターやアンドロゲンレセプターとの結合活性を測定する方法や、ホルモン合成酵素系の阻害活性を測定する方法が知られている。後者では、出生後日齢の異なるラットの各種ホルモン産生
- 25 および組織形成異常を測定する方法、カエルの変態異常を測定する方法、サカナの成熟異常を測定する方法等が知られている[アナリティカル ケミストリー (Analytical Chemistry) 第７０巻、第１５号、第５２８Ａ～５３２Ａ頁（１９９８）]。

 しかしながら現在のところ、注目されている内分泌かく乱物質と疑われている

物質が本当に内分泌かく乱を引き起こすのか、もし引き起こすならどのようなメカニズムで影響を及ぼしているのか、さらに、どのくらいの量をどれくらいの時間摂取すると危険なのかについての明解な解答は得られていない。

5 例えば、現在行われているホルモンレセプターとの結合試験は、一次スクリーニングという見地からすれば、必要かつ重要な方法である。しかし、この方法で得られる結果は、内分泌かく乱物質であることを保証するものではない。すなわち、エストラジオール（天然女性ホルモン）もジェチルスチルベストロール（合成女性ホルモン）もイソフラボン（豆に含まれるヒトには無害な成分）もビスフェノールA（内分泌かく乱物質と疑われている物質）もEC₅₀の値に差はあるものの、
10 全てのエストロゲンレセプターに結合するため、このアッセイ方法ではどの程度の内分泌かく乱作用を持っているか区別できない。これは、従来の酵母を用いたアッセイ系、培養細胞を用いる系、ネズミの子宮重量を測定する系などのいずれの方法でも同じである。

すなわち現在のホルモンレセプターへの結合活性やホルモン合成酵素系の阻害
15 活性を、インビトロで測定する方法は、内分泌かく乱物質測定法としての必要条件是満たしているが、決して十分条件ではない。また、ラット、カエル、サカナ等の生育や形態形成に及ぼす影響をインビボで調べる方法は、感度が低い上複雑で、多数のサンプルを調べるには長時間を必要とする。

また、前述の従来の解析方法では、内分泌かく乱の可能性のある物質と受容体
20 との関係は解析できても、それ以降のシグナル伝達系についての解析はできない。

上記のように環境ホルモンの問題においては、内分泌かく乱物質を確定し、また該物質が内分泌系に与える影響を調べる必要性がある。つまり、内分泌かく乱物質において、どのようなシグナル伝達経路に影響を与えているのか、また内分泌かく乱を引き起こすのはどのような物質なのかを解析する方法が求められている。

25

発明の目的

本発明の目的は、（１）内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子の検出方法、（２）該方法により検出された遺伝子の発現を測定する内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子の検出方法、（３）内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子もし

くは該遺伝子由来のDNA断片を固定化したDNAアレイ、及び（４）内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質の検出方法を提供することにある。

発明の要旨

5 本発明者らは鋭意研究の結果、迅速、高感度でしかも同時に内分泌かく乱物質によって影響を受ける多種類の遺伝子を検出する方法を構築した。また、該遺伝子もしくはその断片を固定化したDNAアレイを用いて、内分泌かく乱物質を検出する方法を見出した。さらに、内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質の検出方法を構築し、本発明を完成するに至った。

10 即ち、本発明の要旨は、

[1] 内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子を検出する方法であって、内分泌かく乱物質を含む試料と接触させた細胞、組織または生物体由来のmRNAまたはそのcDNAを含む核酸試料を調製し、該核酸試料を内分泌かく乱物質の影響を受ける可能性のある遺伝子もしくは該遺伝子由来のDNA断片が固定されたDNAアレイとハイブリダイズさせ、その結果を対照試料由来の核酸試料を用いたものと比較して内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子を選択することを特徴とする遺伝子の検出方法、

15 [2] 下記遺伝子群から選択される遺伝子もしくは該遺伝子由来のDNA断片を使用する[1]記載の遺伝子の検出方法：

- 20 （１）核内レセプター又は核内レセプター転写共役に関与する遺伝子群、
 （２）キナーゼ型伝達に関与する遺伝子群、
 （３）性腺分化に関与する遺伝子群、
 （４）レセプター型キナーゼに関与する遺伝子群、
 （５）中間フィラメントマーカに関与する遺伝子群、
25 （６）細胞周期、成長調節に関与する遺伝子群、
 （７）オンコジーン及び腫瘍抑制に関与する遺伝子群、
 （７）アポトーシスに関与する遺伝子群、
 （８）DNA損傷反応、修復、再構成に関与する遺伝子群、
 （９）レセプターに関与する遺伝子群、

(10) 細胞死及び分化調節に関与する遺伝子群、

(11) 細胞接着、運動性及び浸潤に関与する遺伝子群、

(12) 血管新生促進に関与する遺伝子群、

(13) 細胞浸潤に関与する遺伝子群、

5 (14) 細胞間相互作用に関与する遺伝子群、

(15) R h oファミリー G T P a s e 及びその調節因子に関与する遺伝子群、又は

(16) 成長因子及びサイトカインに関与する遺伝子群、

10 [3] [1]または[2]記載の方法により検出された遺伝子の発現を測定すること
を特徴とする内分泌かく乱物質の検出方法、

[4] 内分泌かく乱物質が下記の分類から選択されることを特徴とする[3]記載
の内分泌かく乱物質の検出方法：

(1) ダイオキシン類、

(2) 有機塩素系化合物類、

15 (3) フェノール類、

(4) フタル酸エステル類、

(5) 芳香族炭化水素類、

(6) 農薬類、

(7) 有機スズ化合物、

20 (8) エストロゲン類、又は

(9) マイレックス、トキサフェン、アルディカーブ又はキーポン、

[5] 内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質を検出する方法であって、当
該物質が含まれると予想される試料と接触させた細胞、組織または生物体由来の
mRNAまたはそのcDNAを含む核酸試料を調製し、該核酸試料を内分泌かく
25 乱物質の影響を受ける遺伝子もしくは該遺伝子由来のDNA断片が固定されたD
NAアレイとハイブリダイズさせ、その結果を対照試料由来の核酸試料を用いた
ものと比較して、内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質を検出することを
特徴とする検出方法、

[6] 内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質が下記の分類に属すること特

徴とする[5]記載の内分泌かく乱物質の検出方法：

- (1) ダイオキシン類、
- (2) 有機塩素系化合物類、
- (3) フェノール類、
- 5 (4) フタル酸エステル類、
- (5) 芳香族炭化水素類、
- (6) 農薬類、
- (7) 有機スズ化合物、
- (8) エストロゲン類、又は

- 10 (9) マイレックス、トキサフェン、アルディカーブ又はキーボン、

[7] 内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子もしくは内分泌かく乱物質の影響を受ける可能性のある遺伝子または該遺伝子由来のDNA断片が固定されていることを特徴とする内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子検出用DNAアレイ、

- 15 [8] 下記遺伝子群から選択される遺伝子あるいは該遺伝子由来のDNA断片が固定されていることを特徴とする[7]記載のDNAアレイ：

- (1) 核内レセプター又は核内レセプター転写共役に関与する遺伝子群、
- (2) キナーゼ型伝達に関与する遺伝子群、
- (3) 性腺分化に関与する遺伝子群、
- (4) レセプター型キナーゼに関与する遺伝子群、
- 20 (5) 中間フィラメントマーカーに関与する遺伝子群、
- (6) 細胞周期、成長調節に関与する遺伝子群、
- (7) オンコジーン及び腫瘍抑制に関与する遺伝子群、
- (8) アポトーシスに関与する遺伝子群、
- (9) DNA損傷反応、修復、再構成に関与する遺伝子群、
- 25 (10) レセプターに関与する遺伝子群、
- (11) 細胞死及び分化調節に関与する遺伝子群、
- (12) 細胞接着、運動性及び浸潤に関与する遺伝子群、
- (13) 血管新生促進に関与する遺伝子群、
- (14) 細胞浸潤に関与する遺伝子群、

(15) 細胞間相互作用に関与する遺伝子群、

(16) R h oファミリー G T P a s e 及びその調節因子に関与する遺伝子群、又は

(17) 成長因子及びサイトカインに関与する遺伝子群、及び

- 5 [9] 遺伝子もしくは該遺伝子由来のDNA断片がスライドガラスに固定されていることを特徴とする [7] 又は[8]記載の内分泌かく乱物質によって影響を受ける遺伝子検出用DNAアレイに関する。

発明の詳細な説明

- 10 (1) 本発明の内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子の検出方法

本明細書において内分泌かく乱物質とは、外因性内分泌かく乱物質もしくは環境ホルモンとも称されるが、動物の生体内に取込まれた場合に、本来、その生体内で営まれている正常なホルモン作用に影響を与える外因性の物質を意味し、正常なホルモン作用を維持するもの、促進するもの及び抑制するものも含まれる。
15 また、正常なホルモン作用に影響を与える可能性のある物質も含まれる。

現在、内分泌かく乱作用を持つと疑われている物質(群)は、約70である。
更にこれらの物質は、日本環境化学会、第24回日本環境化学会講演会資料集

(1998)において、該当物質の分析方法から、(1) カテゴリー1：有機塩素系化合物(例、有機塩素系化合物一般、ポリ塩化ビフェニール(PCB))、

- 20 (2) カテゴリー2：フェノール類(例、フェノール類一般、ビスフェノールA、2,4-ジクロロフェノール、ペンタクロロフェノール)、(3) カテゴリー3：フタル酸エステル類(例、フタル酸エステル類一般)、(4) カテゴリー4：芳香族炭化水素類(例、ベンゾ(a)ピレン、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHA)、ベンゾフェノン、4-ニトロトルエン、スチレン2量体及び3量体、1,2-ジ
25 ブロモ-3-クロロプロパン、スチレン、n-ブチルベンゼン)、(5) カテゴリー5：農薬類(例、農薬類一般、2,4,5-T(トリクロロフェノキシ酢酸)、2,4-D(ジクロロフェノキシ酢酸)、ベノミル、アミトロール、メソミル)、(6) カテゴリー6：有機スズ化合物、(7) カテゴリー7：エストロゲンの7つのカテゴリー、いずれのカテゴリーにも分類されていないダイオキシン類及びカテゴリー

対象外であるマイレックス、トキサフェン、アルディカーブ、キーポン（クロルデコン）に分類されている。それらについて表1に示す。

表1

カテゴリー分類／物質名	
カテゴリー1	カテゴリー3
ポリ塩化ビフェニール類（PCB）	フタル酸ジ-2-エチルヘキシル
ポリ臭化ビフェニール類（PBB）	フタル酸ブチルベンジル
ヘキサクロロベンゼン（HCB）	フタル酸ジ-n-ブチル
ヘキサクロロシクロヘキサン	フタル酸ジシクロヘキシル
クロルデン	フタル酸ジエチル
オキシクロルデン	フタル酸ジペンチル
trans-ノナクロル	フタル酸ジヘキシル
DDT	フタル酸ジプロピル
DDE、DDD	
ケルセン	カテゴリー4
アルドリン	1,2-ジブromo-3-クロロプロパン
エンドリン	ベンゾ(a)ピレン
ディルドリン	アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル
エンドスルファン（ベンゾエピン）	ベンゾフェノン
ヘプタクロル	4-ニトロトルエン
ヘプタクロルエポキシサイド	スチレンの2及び3量体
メトキシクロル	スチレン
オクタクロロスチレン	n-ブチルベンゼン
カテゴリー2	カテゴリー5
ペンタクロロフェノール（PCP）	2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸

アルキルフェノール (C 5 ~ C 9)	2,4-ジクロロフェノキシ酢酸
ビスフェノールA	アミトロール
2,4-ジクロロフェノール	アトラジン
カテゴリー 5 (続き)	カテゴリー 6
アラクロール	トリブチルスズ
シマジン	トリフェニルスズ
エチルパラチオン	
カルバリン	カテゴリー 7
マラチオン	エストラジオール
メソミル	
ニトロフェン	いずれのカテゴリーにも分類されていないもの
トリフルラリン	
ベノミル	ダイオキシン類
マンゼブ (マンコゼブ)	
マンネブ	環境ホルモン物質であるがカテゴリー対象外
メチラム	
メトリブジン	マイレックス
シペルメトリン	トキサフェン
エスフェンバレレート	アルディカーブ
フェンバレレート	キーボン (クロルデコン)
ペルメトリン	
ビンクロゾリン	
ジネブ	
ジラム	

内分泌かく乱物質は上記で列挙したものに限定されるものではなく、たとえばヒトの腫瘍を引き起こすことが知られているジエチルスチルベストロール (DES)、エストロゲン (女性ホルモン) 作用と毒性が確認されているビスフェノー

ルA等も内分泌かく乱作用を有すると考えられる。

これらの物質の一次作用としては、1) ホルモンレセプターとの直接作用（例えば、合成ホルモン製剤、DDT、フタル酸エステル等）、2) 他のレセプターを介する作用（例えば、ダイオキシン等）、3) 代謝阻害作用（例えば、ステロイド代謝阻害剤、アロマターゼや5 α -レダクターゼの阻害剤等）、4) 他のシステムを介する作用（例えば、神経系や免疫系に影響を与える物質）などが知られており、作用様式は多様である〔化学、第53巻、第7号、第12～15頁（1998）〕。

本明細書記載の内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子とは、上記の内分泌かく乱物質によってその発現が対照と比較して促進もしくは抑制される遺伝子と定義する。該遺伝子は、1種類でも複数の種類であってもよい。従って本発明のDNAアレイに固定化する遺伝子は、内分泌かく乱物質が直接的及び／又は間接的にその発現に影響を与える因子に関与している遺伝子という観点から選択すればよい。その発現が促進されるもの及び抑制されるもののいずれもが好適に使用できる。該遺伝子の候補（すなわち、内分泌かく乱物質の影響を受ける可能性のある遺伝子）としては、特に限定されるものではないが、たとえば、表2に示すような、（1）核内レセプター又は核内レセプター転写共役（nuclear receptor or nuclear receptor transcriptional coupling）に関与する遺伝子群、（2）キナーゼ型伝達（kinase-type signal transduction）に関与する遺伝子群、（3）性腺分化（gonad differentiation）に関与する遺伝子群、（4）レセプター型キナーゼ（receptor-type kinase）に関与する遺伝子群、（5）中間フィラメントマーカー（intermediate filament markers）に関与する遺伝子群、（6）細胞周期、成長調節（cell cycle & growth regulators）に関与する遺伝子群、（7）オンコジーン及び腫瘍抑制（oncogenes & tumor suppressors）に関与する遺伝子群、（8）アポトーシス（apoptosis）に関与する遺伝子群、（9）DNA損傷反応、修復、再構成（DNA damage response, repair & recombination）に関与する遺伝子群、（10）レセプター（receptors）に関与する遺伝子群、（11）細胞死及び分化調節（cell fate & development regulators）に関与する遺伝子群、（12）細胞接着、運動性及び浸潤（cell

adhesion, motility & invasion) に関する遺伝子群、(13) 血管新生促進 (angiogenesis regulators) に関する遺伝子群、(14) 細胞浸潤 (invasion regulators) に関する遺伝子群、(15) 細胞間相互作用 (cell-cell interactions) に関する遺伝子群、(16) Rhoファミリー GTPase 及びその調節因子 (Rho family small GTPases & their regulator) に関する遺伝子群、(17) 成長因子及びサイトカイン (growth factors & cytokines) に関する遺伝子群が好適に使用できる。また、これ以外の遺伝子であっても内分泌かく乱物質が、直接的及び／又は間接的にその発現に影響を与える可能性のある因子に関する遺伝子も本発明の内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子に含まれる。

表 2

Gene Name	GenBank Accession #(s)	Classification
type I cytoskeletal 10 keratin; cytokeratin 10 (K10)	X14487	intermediate filament markers
cell division control protein 2 homolog (EC 2.7.1.-);cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)	X05360	cell cycle & growth regulators
cell division protein kinase 4 (EC 2.7.1.-) (PSK-J3)	M14505	cell cycle & growth regulators
type I cytoskeletal 13 keratin; cytokeratin 13 (K13; CK 13)	X14640	intermediate filament markers
type I cytoskeletal 14 keratin; cytokeratin 14 (K14; CK 14)	J00124	intermediate filament markers
type I cytoskeletal 18 keratin; cytokeratin 18 (K18)	M26326	intermediate filament markers
type I cytoskeletal 19 keratin; cytokeratin 19 (K19; CK 19)	Y00503	intermediate filament markers
cyclin-dependent kinase 5 activator precursor (CDK5 activator)	X80343	cell cycle & growth regulators
cell division cycle protein 25A tyrosine phosphatase (cdc25A); M-phase inducer phosphatase 1 (EC 3.1.3.48)	M81933	cell cycle & growth regulators
CDC25B; M-phase inducer phosphatase 2 (EC 3.1.3.48)	S78187	cell cycle & growth regulators
cdc25C; M-phase inducer phosphatase 3 (EC 3.1.3.48)	M34065	cell cycle & growth regulators

CLK-2	L29218	cell cycle & growth regulators
CLK-3	L29220	cell cycle & growth regulators
serine/threonine-protein kinase KKIALRE	X66358	cell cycle & growth regulators
type II cytoskeletal 11 keratin; cytokeratin 1 (K1; CK 1); 67-kDa cytokeratin; hair alpha protein	M98776	intermediate filament markers
CDC2-related protein kinase CHED	M80629	cell cycle & growth regulators
cdc2-related protein kinase PISSLRE	L33264	cell cycle & growth regulators
cyclin A	X51688	cell cycle & growth regulators
type II cytoskeletal 4 keratin; cytokeratin 4 (K4; CK4)	X07695	intermediate filament markers
cyclin C G1/S-specific	M74091	cell cycle & growth regulators
type II cytoskeletal 5 keratin; cytokeratin 5 (K5; CK 5); 58-kDa cytokeratin	M21389	intermediate filament markers
cyclin D2	D13639	cell cycle & growth regulators
cyclin E	M73812	cell cycle & growth regulators
cyclin G1	X77794	cell cycle & growth regulators
cyclin G2	U47414	cell cycle & growth regulators
type II cytoskeletal 6 keratin; cytokeratin 6B (CK 6B); K6B keratin	L42610	intermediate filament markers
AMP deaminase isoform L (AMPD2) mRNA	M91029	cell cycle & growth regulators
type II cytoskeletal 7 keratin; cytokeratin 7 (K7; CK 7)	M13955	intermediate filament markers
CDK6 inhibitor 2c (p18) mRNA, complete cds	U17074	cell cycle & growth regulators
type II cytoskeletal 8 keratin; cytokeratin 8 (K8; CK 8)	X74929	intermediate filament markers
p35 cyclin-like CAK1-associated protein	X87843	cell cycle & growth regulators
wee1Hu CDK tyrosine 15-kinase; wee- 1-like protein kinase	U10564	cell cycle & growth regulators
serine/threonine-protein kinase PLK (EC 2.7.1.-) (PLK-1) (STPK13)	U01038	cell cycle & growth regulators
phospholipase D1 (PLD 1); choline phosphatase 1	U38545	cell cycle & growth regulators
CDC10 protein homolog	S72008	cell cycle & growth regulators
CDC27HS Protein	S78234	cell cycle & growth regulators
CDC16HS	U18291	cell cycle & growth regulators
CDC37 homolog	U43077	cell cycle & growth regulators
CDC6-related protein	U77949	cell cycle & growth regulators
extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1)	X60188	cell cycle & growth regulators
extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2)	Z11695	cell cycle & growth regulators

extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3)	X80692	cell cycle & growth regulators
extracellular signal-regulated kinase 4 (ERK4)	X59727	cell cycle & growth regulators
extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5)	U29726	cell cycle & growth regulators
mitogen-activated protein kinase p38 (MAP KINASE p38)	L35263	cell cycle & growth regulators
vimentin	Z19554	intermediate filament markers
profilin	J03191	intermediate filament markers
c-jun N-terminal kinase 3 (JNK3)	U34819	cell cycle & growth regulators
dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 5	U25265	cell cycle & growth regulators
dual-specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1	L11284	cell cycle & growth regulators
dual-specificity mitogen-activated protein kinase kinase 6	U39065	cell cycle & growth regulators
PCNA; cyclin	M15796	cell cycle & growth regulators
retinoblastoma-binding protein (RBP)	S66427	cell cycle & growth regulators
RBQ1 retinoplastoma binding protein	X85133	oncogenes & tumor suppressors
E2F-3	D38550	cell cycle & growth regulators
E2F-5	U31556	cell cycle & growth regulators
E2F-related transcription factor	L23959	cell cycle & growth regulators
basic transcription factor 2 p44 (btf2p44) gene	U80017	cell cycle & growth regulators
transcription factor DP2 (Humdp2); E2F dimerization partner 2	U18422	cell cycle & growth regulators
growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) isoform	M96995	cell cycle & growth regulators
GRB-IR / GRB10	D86962	cell cycle & growth regulators
raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase (raf-1; c-raf)	X03484	cell cycle & growth regulators
b-raf	M95712	cell cycle & growth regulators
jun B transactivator	U20734	cell cycle & growth regulators
N-myc oncogene protein	Y00664	cell cycle & growth regulators
C-myc binding protein	D89667	cell cycle & growth regulators
p53-dependent cell growth regulator CGR19	U66469	apoptosis
apoptosis regulator bcl-2	M14745	apoptosis
Bcl2 and p53 binding protein Bbp/53BP2 (BBP/53BP2)	U09582	apoptosis
clone 53BP1 p53-binding protein mRNA, partial cds	U09477	apoptosis
apoptosis regulator bcl-w; KIAA0271	D87461	apoptosis
induced myeloid leukemia cell differentiation protein MCL-1	L08246	apoptosis

bcl-2-related protein A1; bfl-1 protein	U29680	apoptosis
BCL-2 homologous antagonist/killer (BAK) protein	U23765	apoptosis
brain-related apoptosis gene (BRAG-1); Bcl-2 homolog	AB011170	apoptosis
BAD protein (BCL-2 binding component 6)	U66879	apoptosis
BCL2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 2 (BNIP2) mRNA, complete cds	U15173	apoptosis
BCL2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 1 (BNIP1) mRNA, complete cds	AF083957	apoptosis
interleukin-1 beta convertase precursor (IL-1BC)	M87507	apoptosis
apopain precursor; cysteine protease CPP32; YAMA protein	U13737	apoptosis
ICH-2 protease precursor (EC 3.4.22.-); TX protease (ICEREL-II); caspase-4	U28014; U28015	apoptosis
cysteine protease MCH2 isoforms alpha and beta (MCH2); caspase-6 precursor (EC 3.4.22.-)	U20537	apoptosis
caspase-7 precursor (EC 3.4.22.-)	U37448	apoptosis
Apo-2 ligand; TNF-related apoptosis inducing ligand TRAIL	U37518	apoptosis
caspase-8 precursor (EC 3.4.22.-)	X98173	apoptosis
caspase-9 precursor (EC 3.4.22.-)	U56390	apoptosis
caspase-10 precursor; ICE-LIKE apoptotic protease 4	U60519	apoptosis
tyrosine-protein kinase receptor tyro3 precursor; tyrosine-protein kinase TRAF5	D17517 AB000509	oncogenes & tumor suppressors apoptosis
TRAF6	U78798	apoptosis
TRAF-interacting protein I-TRAF; TRAF family member-associated NF-kB activator TANK	U59863	apoptosis
TRAF-interacting protein (TRIP)	U77845	apoptosis
serine/threonine protein kinase NIK; binds specifically to TRAF2	Y10256	apoptosis
casper, a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis (CASH-alpha + CASH-beta)	AF015450	apoptosis
cytotoxic ligand TRAIL receptor	AF016266	apoptosis
death domain containing protein CRADD	U79115	apoptosis
receptor interacting protein	U25994	apoptosis
DAXX; a FAS-binding protein that activates JNK and apoptosis	AF039136	apoptosis

tumor necrosis factor type 2 receptor associated protein (TRAP3)	U12597	apoptosis
CD40 receptor associated factor 1 (CRAF1)	U21092	apoptosis
inhibitor of apoptosis protein1 (IAP-1) (C-IAP2)	U45878	apoptosis
inhibitor of apoptosis protein 2 (IAP-2)	U45879	apoptosis
TNF-alpha converting enzyme	U69611	apoptosis
ionizing radiation resistance-conferring protein; death-associated protein 3 (DAP-3)	U18321	apoptosis
Fas-activated serine/threonine (FAST) kinase	X86779	apoptosis
c-yes-1	M15990	oncogenes & tumor suppressors
FAS/APO 1	D49396	apoptosis
5'-AMP activated protein kinase, gamma1	U42412	oncogenes & tumor suppressors
Akt1; rac protein kinase alpha; protein kinase B; c-Akt	M63167	apoptosis
AKT2; rac protein kinase beta	M77198	apoptosis
seven in absentia homolog	U63295	apoptosis
signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta (STAT1)	M97935	oncogenes & tumor suppressors
apoptosis-related protein TFAR15 (TFAR15)	AF022385	apoptosis
signal transducer and transcription activator 5B (STAT5B)	U47686	oncogenes & tumor suppressors
CD27BP (Siva)	U82938	apoptosis
CSE1	AF053640	apoptosis
apoptosis inhibitor survivin	U75285	apoptosis
proto-oncogene rhoA multidrug resistance protein; GTP-binding protein (rhoA)	L25080	apoptosis
Pig7 (PIG7)	AF010312	apoptosis
Pig10 (PIG10)	AF010314	apoptosis
Pig11 (PIG11)	AF010315	apoptosis
Pig12 (PIG12)	AF010316	apoptosis
glutathione-S-transferase homolog	U90313	apoptosis
cdc42 homolog (G25K) (brain isoform + placental isoform)	U02570	apoptosis
macrophage colony stimulating factor I receptor precursor (CSF-1-R)	X03663	oncogenes & tumor suppressors
C-fos	V01512	oncogenes & tumor suppressors
c-kit	X06182	oncogenes & tumor suppressors
fgr proto-oncogene encoded p55-c-fgr protein	M19722	oncogenes & tumor suppressors

DNA mismatch repair protein MSH2	U03911	oncogenes & tumor suppressors
DNA mismatch repair protein MSH6 (mutS alpha 160-kDa subunit)	U54777	oncogenes & tumor suppressors
K-ras oncogene	M54968	oncogenes & tumor suppressors
MET	J02958	oncogenes & tumor suppressors
breast cancer susceptibility (BRCA2)	X95152	oncogenes & tumor suppressors
BRCA1-associated ring domain protein	U76638	oncogenes & tumor suppressors
p53 cellular tumor antigen	X54156	oncogenes & tumor suppressors
mdm2 protein; p53-associated protein	M92424	oncogenes & tumor suppressors
retinoblastoma susceptibility	L41870	oncogenes & tumor suppressors
RB2/p130	X74594	oncogenes & tumor suppressors
RBA/p48	X74262	oncogenes & tumor suppressors
RBP2 retinoblastoma binding protein	S66431	oncogenes & tumor suppressors
GADD153=growth arrest and DNA- damage-inducible	S40706	DNA damage response, repair & recombination
insulin-like growth factor I receptor (IGF1R)	X04434	receptors
DNA-PK catalytic subunit (XRCC7)	U47077	DNA damage response, repair & recombination
ataxia telangiectasia (ATM)	U82828	DNA damage response, repair & recombination
cation-independent mannose-6- phosphate receptor precursor (CI man- 6-P receptor; CI-MPR)	Y00285	receptors
Ku protein subunit; ATP-dependent DNA helicase II 70-kDa subunit	M32865	DNA damage response, repair & recombination
Ku (p70/p80) subunit; ATP-dependent DNA helicase II 86-kDa subunit	M30938	DNA damage response, repair & recombination
DNA excision repair protein ERCC1	M13194	DNA damage response, repair & recombination
DNA ligase III (LIG3); polydeoxyribonucleotide synthase	X84740	DNA damage response, repair & recombination
DNA ligase IV; polydeoxyribonucleotide synthase (ATP)	X83441	DNA damage response, repair & recombination
DNA polymerase alpha-subunit	X06745	DNA damage response, repair & recombination
insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	X16302	receptors
recA-like protein HsRad51; DNA repair protein RAD51 homolog	L07493	DNA damage response, repair & recombination
DNA damage repair and recombination protein RAD52	U12134	DNA damage response, repair & recombination
DNA topoisomerase I (TOP1)	M60706	DNA damage response, repair & recombination

growth hormone-dependent insulin-like growth factor-binding protein	M35878	receptors
IGFBP5	L27560	receptors
DNA excision repair protein ERCC2 3' end; DNA-repair protein complementing XP-D cells	X52222	DNA damage response, repair & recombination
IGFBP6	M62402	receptors
ERCC5 excision repair protein	X69978	DNA damage response, repair & recombination
6-O-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT); methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase	M29971	DNA damage response, repair & recombination
muscle-specific DNase I-like (DNase X)	X90392	DNA damage response, repair & recombination
DNA mismatch repair protein hmlh1	U07418	DNA damage response, repair & recombination
GTP-binding protein ras associated with diabetes (RAD1)	L24564	DNA damage response, repair & recombination
replication factor C 37-kDa subunit	M87339	DNA damage response, repair & recombination
replication factor C 38-kDa subunit (RFC38); activator 1 38-kDa subunit	L07541	DNA damage response, repair & recombination
replication protein A 70-kDa subunit (RP-A) (RF-A); single-stranded DNA-binding protein	M63488	DNA damage response, repair & recombination
superoxide dismutase 1 cytosolic	X02317	DNA damage response, repair & recombination
single-stranded DNA-binding protein pur-alpha	M96684	DNA damage response, repair & recombination
HHR6A (yeast RAD 6 homolog)	M74524	DNA damage response, repair & recombination
lysozyme	M19045	DNA damage response, repair & recombination
Notch2 Notch homolog 3	U97669	cell fate & development regulators
CDW40 antigen; CD40L receptor precursor	X60592	receptors
Jagged 1	AF028593	cell fate & development regulators
Jagged 2	AF029778	cell fate & development regulators
delta-like protein precursor (dlk); contains fetal antigen 1 (FA1) (DLK)	U15979	cell fate & development regulators
lunatic fringe	U94354	cell fate & development regulators
wnt-2 protein precursor; IRP protein; int-1 related protein	X07876	cell fate & development regulators

Wnt-5a	L20861	cell fate & development regulators
frizzled-related FrzB (Fritz); frezzled (fre)	U24163	cell fate & development regulators
dishevelled 2 (DVL)	AF006012	cell fate & development regulators
patched homolog (PTC)	U43148	cell fate & development regulators
smoothened	U84401	cell fate & development regulators
retinoic acid receptor epsilon (RAR-epsilon); retinoic acid receptor beta2 (RAR-beta2)	Y00291	receptors
tumor necrosis factor type 1 receptor associated protein (TRAP1) mRNA, partial cds	U12595	receptors
Tumor necrosis factor receptor 2 (75kD) (TNFR2)	U52165	receptors
epidermal growth factor receptor substrate 15 (EPS15); AF-1P protein	U07707	receptors
epidermal growth factor receptor kinase substrate EPS8	U12535	receptors
erythropoietin receptor (EPOR)	M60459	receptors
NT-3 growth factor receptor precursor; trk-c tyrosine kinase; GP145-TRKC	U05012	receptors
GARP	Z24680	receptors
retinoic acid receptor alpha (RXRA)	X52773	receptors
HGF activator like	D49742	receptors
N-sam; fibroblast growth factor receptor1 precursor (FGFR1)	X66945	receptors
low-affinity nerve growth factor receptor (NGF receptor; NGFR); GP80-LNGFR	M14764	receptors
platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA); CD140A antigen	M21574	receptors
beta platelet-derived growth factor receptor precursor (PDGFR-beta); CD140B antigen	J03278	receptors
colon carcinoma kinase-4 (CCK4); transmembrane receptor precursor (PTK7)	U33635	receptors
retinoic acid receptor gamma	M38258	receptors
transforming growth factor (TGF)-beta receptor type III precursor (TGFR-3); betaglycan	L07594	receptors
transmembrane protein TMP21	AJ004913	receptors
high-affinity nerve growth factor	X03541	receptors

receptor precursor		
brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/NT-3 growth factors receptor precursor	U12140	receptors
hemopoietic progenitor cell CD34 antigen precursor	S53910	cell adhesion, motility & invasion
CD59	M84349	cell adhesion, motility & invasion
angiopoietin 1 receptor precursor; tyrosine-protein kinase receptor TIE-2	L06139	angiogenesis regulators
collagen type I	J03464	cell adhesion, motility & invasion
collagen type II alpha-1	X16468	cell adhesion, motility & invasion
collagen type III pro-alpha-1	X14420	cell adhesion, motility & invasion
collagen type IV alpha	M26576	cell adhesion, motility & invasion
collagen type VI alpha-3	X52022	cell adhesion, motility & invasion
collagen type VIII alpha-1	X57527	cell adhesion, motility & invasion
vascular endothelial growth factor B precursor (VEGF-B)	U43368	angiogenesis regulators
collagen type XI pro-alpha-2	U32169	cell adhesion, motility & invasion
collagen type XVI alpha-1	M92642	cell adhesion, motility & invasion
collagen type XVIII alpha	L22548	cell adhesion, motility & invasion
laminin alpha-4 subunit precursor (LAMA4)	S78569	cell adhesion, motility & invasion
laminin beta-2 subunit precursor (LAMB2); S-laminin	M94362	cell adhesion, motility & invasion
laminin beta-1 subunit precursor (LAMB1); laminin B1 chain	M61916	cell adhesion, motility & invasion
laminin gamma-1 subunit precursor (LAMG1); laminin B2 chain	M55210	cell adhesion, motility & invasion
laminin 67kDa RECEPTOR	X15005	cell adhesion, motility & invasion
nidogen precursor (NID); entactin	M30269	cell adhesion, motility & invasion
t nascin precursor (TN); hexabrachion; cytotactin; neuronectin	X78565	cell adhesion, motility & invasion
versican core protein precursor; large fibroblast proteoglycan	J02814	cell adhesion, motility & invasion

sparc precursor (secreted protein acidic and rich in cysteine; osteonectin) (ON)	J03040	cell adhesion, motility & invasion
thrombospondin 1 precursor	X14787	cell adhesion, motility & invasion
thrombospondin 2 precursor	L12350	cell adhesion, motility & invasion
vitronectin precursor; serum spreading factor; S-protein (contains somatomedin B)	X03168	cell adhesion, motility & invasion
fibronectin precursor (FN)	X02761	cell adhesion, motility & invasion
heparan sulfate proteoglycan (HSPG2)	M85289	cell adhesion, motility & invasion
integrin alpha subunit	X68742	cell adhesion, motility & invasion
vascular endothelial growth factor C precursor (VEGF-C)	U43142	angiogenesis regulators
integrin alpha-3 chain	M59911	cell adhesion, motility & invasion
integrin alpha-4 subunit precursor (integrin alpha-IV; ITGA4); VLA-4; CD49D antigen	L12002	cell adhesion, motility & invasion
placenta growth factors 1 (PLGF-1)	X54936	angiogenesis regulators
integrin alpha 7B	X74295	cell adhesion, motility & invasion
integrin alpha9	D25303	cell adhesion, motility & invasion
integrin alpha-E precursor (ITGAE); mucosal lymphocyte-1 antigen; hml-1 antigen; CD103 antigen	L25851	cell adhesion, motility & invasion
integrin beta1	M34189	cell adhesion, motility & invasion
integrin beta 4	X53587	cell adhesion, motility & invasion
integrin beta-5 subunit (ITGB5)	J05633	cell adhesion, motility & invasion
integrin beta8	M73780	cell adhesion, motility & invasion
focal adhesion kinase (FADK); proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2)	L13616	cell adhesion, motility & invasion
integrin-linked kinase (ILK)	U40282	cell adhesion, motility & invasion
cell adhesion kinase beta (CAKbeta); protein tyrosine kinase Pyk2	U43522	cell adhesion, motility & invasion
paxillin	U14588	cell adhesion, motility & invasion
alpha 1,2-mannosidase 1B mRNA	AF027156	cell adhesion, motility &

		invasion
zyxin related protein ZRP-1	AF000974	cell adhesion, motility & invasion
beta 3-endonexin	U37139	cell adhesion, motility & invasion
cytohesin-1; Sec7p-like protein	U70728	cell adhesion, motility & invasion
CD9 antigen; p24; leukocyte antigen MIC3; motility-related protein (MRP-1)	M38690	cell adhesion, motility & invasion
ezrin (cytovillin 2)	X51521	cell adhesion, motility & invasion
moesin-ezrin-radixin-like protein; merlin; schwannomin; neurofibromatosis 2	L11353	cell adhesion, motility & invasion
neural cell adhesion molecule L1 precursor (N-CAM L1); MIC5	AF002246	cell adhesion, motility & invasion
ninjurin-1	U91512	cell adhesion, motility & invasion
formyl peptide receptor 1	M60626	cell adhesion, motility & invasion
P37NB	U32907	cell adhesion, motility & invasion
semaphorin (CD100)	U60800	cell adhesion, motility & invasion
semaphorin E	AB000220	cell adhesion, motility & invasion
TAX1; axonin-1/TAQ1	X67734	cell adhesion, motility & invasion
leukocyte antigen related protein precursor (LAR); PTPRF	Y00815	cell adhesion, motility & invasion
hyaluronan receptor (RHAMM)	U29343	cell adhesion, motility & invasion
platelet glycoprotein IV (GPIV) (GPIIIB; CD36 antigen) (PAS IV); PAS-4 protein	M98399	cell adhesion, motility & invasion
caveolin-2	AF035752	cell adhesion, motility & invasion
FGFR3; FLG-2	M64347	angiogenesis regulators
keratinocyte growth factor receptor (KGFR); fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)	M80634	angiogenesis regulators
MMP-1; collagenase-1	X54925	invasion regulators
MMP-2; gelatinase A	Z48482	invasion regulators
MMP-16	D85511	invasion regulators
MMP-7; matrilysin	X07819	invasion regulators
EB1 (protein that binds to APC)	U51677	cell-cell interactions
MMP-10; stromelysin-2	X07820	invasion regulators

MMP-13; collagenase-3	X75308	invasion regulators
protocadherin 43	L11373	cell -cell interactions
desmoplakin I	M77830	cell -cell interactions
envoplakin (EVPL)	U53786	cell -cell interactions
bullous pemphigoid antigen	M69225	cell -cell interactions
TIMP-2 (MI)	J05593	invasion regulators
TIMP-3; mitogen-inducible gene 5 (mig-5)	Z30183	invasion regulators
basigin precursor (BSG); leukocyte activation antigen M6	X64364	invasion regulators
urokinase-type plasminogen activator precursor (EC 3.4.21.73); U-plasminogen activator (UPA)	X02419	invasion regulators
tissue-type plasminogen activator precursor (EC 3.4.21.68); T-plasminogen activator (T-PA)	M15518	invasion regulators
plasminogen precursor (EC 3.4.21.7)	M34276	invasion regulators
placental plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2); monocyte ARG-serpin; urokinase inhibitor; PLANH2	Y00630	invasion regulators
protein C inhibitor; plasma serine protease inhibitor precursor; plasminogen activator inhibitor-3 (PAI3)	M68516	invasion regulators
urokinase-type plasminogen activator receptor	U09937	invasion regulators
low-density lipoprotein receptor-related protein 1 precursor (LRP); alpha-2-macroglobulin receptor (A2MR)	X13916	invasion regulators
alpha-2-macroglobulin precursor (alpha-2-M)	M11313	invasion regulators
platelet basic protein precursor (PBP)	M54995	invasion regulators
alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein precursor (alpha-2-MRAP)	M63959	invasion regulators
nucleoside diphosphate kinase A (EC 2.7.4.6) (NDK A)	X17620	invasion regulators
c-myc purine-binding transcription factor puf; nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B; NDK B)	M36981	invasion regulators
nm23-H4; nucleoside-diphosphate kinase (EC 2.7.4.6); nucleoside 5'-diphosphate phosphotransferase (NDK)	Y07604	invasion regulators
in malignant melanoma metastasis-suppressor (KiSS-1) gene	U43527	invasion regulators
metastasis-associated MTA1	U35113	invasion regulators

metalloprotease/disintegrin/cysteine-rich protein precursor (MDC9)	U41766	invasion regulators
DDX8; RNA helicase	D50487	invasion regulators
forkhead-like 7	AF048693	Rho family small GTPases & their regulator
rhoG	X61587	Rho family small GTPases & their regulator
Rho6 protein	Y07923	Rho family small GTPases & their regulator
Rho8 protein	X95282	Rho family small GTPases & their regulator
ephrin-B3 precursor; eph-related receptor tyrosine kinase ligand 8 (LERK-8)	U66406	cell-cell interactions
ras-like protein TC10	M31470	Rho family small GTPases & their regulator
ras-like small GTPase TTF	Z35227	Rho family small GTPases & their regulator
rhoHP1	D85815	Rho family small GTPases & their regulator
rho-associated coiled-coil containing protein kinase p160ROCK	U43195	Rho family small GTPases & their regulator
CDC42 GTPase-activating protein	U02570	Rho family small GTPases & their regulator
T-lymphoma invasion and metastasis inducing TIAM1	U16296	Rho family small GTPases & their regulator
rho/rac guanine nucleotide exchange factor (rho/rac GEF); faciogenital dysplasia protein (FGD1)	U64105	Rho family small GTPases & their regulator
ephrin type-A receptor 2 precursor; epithelial cell kinase (ECK); tyrosine-protein kinase receptor ECK	M59371	cell-cell interactions
rho GDP dissociation inhibitor 2 (rho GDI 2); LY-GDI	L20688	Rho family small GTPases & their regulator
rho GDP dissociation inhibitor 1 (rho GDI 1)	X69550	Rho family small GTPases & their regulator
p21-activated kinase; p65-PAK; serine/threonine-protein kinase PAK-alpha	U24152	Rho family small GTPases & their regulator
neural-cadherin precursor (N-cadherin); cadherin-2	S42303	cell-cell interactions
cadherin-3 placental-cadherin precursor; P-cadherin	X63629	cell-cell interactions
cadherin-5 vascular endothelial-cadherin precursor; VE-cadherin; 7B4 antigen; CD144 antigen	X79981	cell-cell interactions
cadherin-6	D31784	cell-cell interactions

cadherin-8	L34060	cell -cell interactions
casein kinase II, alpha subunit	J02853	cell -cell interactions
ephrin type-B receptor 2 precursor; tyrosine-protein kinase receptor EPH- 3; DRT; HEK; ERK	L41939	cell -cell interactions
cadherin-13 T-cadherin precursor (truncated-cadherin); H-cadherin; heart-cadherin	U59289	cell -cell interactions
cadherin-14 muscle-cadherin precursor; M-cadherin; cadherin-14; cadherin-15	U59325	cell -cell interactions
alpha-catenin; cadherin-associated protein; alpha E-catenin	D13866	cell -cell interactions
alpha-catenin related protein (catenin alpha-2)	M94151	cell -cell interactions
beta-catenin	X87838	cell -cell interactions
tyrosine-protein kinase HCK (EC 2.7.1.112); P59-HCK & P60-HCK; hemopoietic cell kinase	M16591	cell -cell interactions
APC	M73548	cell -cell interactions
Tumor necrosis factor member2 (TNF)	X02910	growth factors & cytokines
amphiregulin (AR); colorectum cell- derived growth factor (CRDGF)	M30704	growth factors & cytokines
brain-derived neurotrophic factor (BDNF)	M61176	growth factors & cytokines
beta NGF	X52599	growth factors & cytokines
clone pSK1 interferon gamma receptor accessory factor-1 (AF-1); interferon- gamma receptor beta chain	U05875	growth factors & cytokines
BIGH3	M77349	growth factors & cytokines
bone morphogenetic protein 1 (BMP1)	U50330	growth factors & cytokines
interferon-alpha/beta receptor alpha subunit precursor (IFN-alpha receptor; IFNAR)	J03171	growth factors & cytokines
bone morphogenetic protein 3B	D49493	growth factors & cytokines
bone morphogenetic protein 2B (BMP2B)	D30751	growth factors & cytokines
bone morphogenetic protein 6	M60315	growth factors & cytokines
bone morphogenetic protein 7; osteogenic protein 1	X51801	growth factors & cytokines
bone morphogenetic protein 8; osteogenic protein 2	M97016	growth factors & cytokines
BPGF-1	L42379	growth factors & cytokines
connective tissue growth factor (CTGF)	M92934	growth factors & cytokines

heparin-binding EGF-like growth factor (HBEGF); diphtheria toxin receptor (DTR)	M60278	growth factors & cytokines
interferon-alpha/beta receptor beta subunit precursor (IFN-alpha-R)	L42243	growth factors & cytokines
fibrillin 2 (congenital contractural arachnodactyly)	U03272	growth factors & cytokines
FGF2; heparin-binding growth factor 2 precursor; prostatropin	J04513	growth factors & cytokines
keratinocyte growth factor (KGF); fibroblast growth factor 7 (FGF-7)	M60828	growth factors & cytokines
cytokine humig; interferon-gamma-induced monokine (MIG)	X72755	growth factors & cytokines
glia maturation factor beta (GMF-beta)	M86492	growth factors & cytokines
glial growth factor precursor (GGFHPP2); neuregulin; heregulin-beta1	L12261	growth factors & cytokines
transforming growth factor beta2 precursor (TGF-beta2; TGFB2)	M19154	growth factors & cytokines
interferon-gamma induced protein precursor (gamma-IP10)	X02530	growth factors & cytokines
transcription factor ETR103; early growth response protein 1 (EGR-1) (KROX24)	X52541	growth factors & cytokines
hepatocyte growth factor-like protein; macrophage-stimulating protein (MSP)	L11924	growth factors & cytokines
hepatoma-derived growth factor (HDGF)	D16431	growth factors & cytokines
hepatocyte growth factor (HGF); scatter factor (SF); hepatopoeitin A	X16323	growth factors & cytokines
interleukin-1 receptor antagonist protein precursor (IL-1RA; IRAP)	U65590	growth factors & cytokines
interleukin-1 alpha precursor (IL-1 alpha; IL1A); hematopoietin-1	M28983	growth factors & cytokines
interleukin-1 beta precursor (IL-1 ; IL1B); catabolin	K02770	growth factors & cytokines
MADER	X70991	growth factors & cytokines
interleukin-6 precursor (IL-6); B-cell stimulatory factor 2 (BSF-2)	X04430	growth factors & cytokines
interleukin-15 (IL-15)	U14407	growth factors & cytokines
interferon gamma precursor (IFN-gamma; IFNG); immune interferon	V00543	growth factors & cytokines
leukocyte interferon-inducible peptide	X57351	growth factors & cytokines
leukemia inhibitory factor precursor (LIF); differentiation-stimulating factor (D factor)	X13967	growth factors & cytokines
PDGF associated protein	U41745	growth factors & cytokines

platelet-derived growth factor A subunit precursor (PDGFA; PDGF-1)	X06374	growth factors & cytokines
platelet-derived growth factor B subunit precursor (PDGFB; PDGF2); bacaplermin; c-sis	X02811	growth factors & cytokines
stromal cell derived factor 1 precursor (SDF1); pre B-cell growth stimulating factor (PBSF)	L36033	growth factors & cytokines
TGF- β superfamily receptor type I (ALK-1) (SRK3)	L17075	growth factors & cytokines
transforming growth factor-beta 3 (TGF-beta3)	X14885	growth factors & cytokines
thrombopoietin precursor (THPO); megakaryocyte colony stimulating factor	L33410	growth factors & cytokines
transforming growth factor-alpha (TGF-alpha; TGFA); EGF-like TGF (ETGF)	X70340	growth factors & cytokines
interferon-stimulated transcription factor 3, gamma (48kD)	M87503	growth factors & cytokines
ubiquitin	S79522	housekeeping gene
phospholipase A2	U03090	housekeeping gene
adenine phosphoribosyltransferase (APRT)	Y00486	housekeeping gene
tubulin alpha	L11645	housekeeping gene
HLA class I histocompatibility antigen A-3 alpha chain (MHC)	D32129	housekeeping gene
aortic-type smooth muscle alpha-actin gene, exon 9	3216M3	housekeeping gene
ribosomal protein S5	U14970	housekeeping gene
p300/CBP	U47741	nuclear receptor or nuclear receptor transcriptional coupling
SRC-1	U40396	nuclear receptor or nuclear receptor transcriptional coupling
N-CoR/SMRT	AF044209/ U37146	nuclear receptor or nuclear receptor transcriptional coupling
ACTR	AF036892	nuclear receptor or nuclear receptor transcriptional coupling
RIP140	X84373	nuclear receptor or nuclear receptor transcriptional coupling
TRIP1	L38810	nuclear receptor or nuclear receptor transcriptional coupling
TIF2	X97674	nuclear receptor or nuclear receptor transcriptional coupling
Smad3	AB004924	nuclear receptor or nuclear receptor transcriptional coupling
iefp	D21205	nuclear receptor or nuclear receptor transcriptional coupling

lactoferrin	X53961	nuclear receptor or nuclear receptor transcriptional coupling
progesteron receptor	M15716	nuclear receptor or nuclear receptor transcriptional coupling
cathepsin G	J04990	nuclear receptor or nuclear receptor transcriptional coupling
pS2 protein	X52003	nuclear receptor or nuclear receptor transcriptional coupling
prolactin	E02152	nuclear receptor or nuclear receptor transcriptional coupling
ARA70	L49399	nuclear receptor or nuclear receptor transcriptional coupling
vitamin D receptor	J03258	nuclear receptor or nuclear receptor transcriptional coupling
p38	L35253	kinase-type signal transduction
p38 gamma	U66243	kinase-type signal transduction
JNK1	L26318	kinase-type signal transduction
JNK2	U09759	kinase-type signal transduction
JNK3	AA992006	kinase-type signal transduction
ERK1	M76585	kinase-type signal transduction
BMKa,b,g	U29725- U29727	kinase-type signal transduction
DAX1	U31929	gonad differentiation
SOX9	Z46629	gonad differentiation
WT1	X51630	gonad differentiation
SRY	L10101	gonad differentiation
Ad4BP/SF-1	D84206- D84209	gonad differentiation
EMX2	X68880	gonad differentiation
c-Fos	K00650/ M16287	oncogenes & tumor suppressors
c-Myc	J00120/ K01908	oncogenes & tumor suppressors

Bcl-2	M13994- M13995	oncogenes & tumor suppressors
Bax a,b,g	L22473- L22475	oncogenes & tumor suppressors
Bax d	U19599	oncogenes & tumor suppressors
Bcl-x	U72398	oncogenes & tumor suppressors
NGF receptor	M14764	receptor-type kinase
FGF receptor	M34641	receptor-type kinase
VEGF receptor	AF016050	receptor-type kinase
PDGF receptor	M21616	receptor-type kinase
CSF1 receptor	M33208- M33210	receptor-type kinase
EGF receptor	M29366	receptor-type kinase
insulin receptor	M10051	receptor-type kinase

- 5 内分泌かく乱物質の影響を受ける可能性のある遺伝子として、さらに、具体的には、上記ジエチルスチルベストロール、ビスフェノールAあるいは、 17β -エストラジオール等が結合することが知られているエストロゲンレセプター遺伝子及びそのシグナル伝達経路に関与する遺伝子等が挙げられる。

上記内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子は、以下の方法により検出することができる。

- 10 本明細書において使用されるDNAアレイとは、支持体上に遺伝子または該遺伝子由来のDNA断片が固定されているものを示し、例えばDNAチップと呼称されているものを包含する。支持体は、ハイブリダイゼーションに使用可能なものであれば特に限定はなく、通常スライドガラス、シリコンチップ、ニトロセルロースやナイロンの膜等が使用される。また、支持体上に固定される遺伝子またはそのDNA断片としては、特に限定するものではないが、例えば、以下のよう
- 15 ク アクセッション番号 (GenBank Accession No.) より

得られる遺伝子の塩基配列をもとに、オリゴTM プライマー アナリシス ソフトウェア (OligoTM Primer Analysis Software、宝酒造社製) のようなプライマー解析・構築ソフトを使用して、本発明の方法に最適なPCR増幅用プライマー対を作製することができる。該プライマー対を用いて、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリーあるいは、cDNAライブラリーを鋳型とし、市販のPCRキットに添付されている標準プロトコール条件に従い、目的のPCR増幅断片を得ることができる。得られた該DNA断片は、例えば、マイクロコンー100 (宝酒造社製) 等を用いて精製することができる。この精製したDNA断片は、本発明の方法に好適に使用する事ができる。さらに、上記の遺伝子またはその断片を公知の方法、例えばアミノ基を導入した支持体上に固定することにより該DNAアレイを作製することができる。また、上記固定化の操作をDNAアレイ作製装置、例えばGMS社製のDNAチップ作製装置を使用して行なうことにより、遺伝子が高密度に整列、固定化されたDNAアレイを作製することもできる。

このようなDNAアレイを使用することにより、核酸試料中に含まれる多種類の核酸分子の量を同時に測定することができる。また、少量の核酸試料でも測定できるという利点がある。

本発明で使用されるDNAアレイには、任意の遺伝子、又は該遺伝子由来のDNA断片が固定される。特に好ましくは、内分泌かく乱作用に関連した機能を有することが予想されるタンパクをコードする遺伝子または該遺伝子由来のDNA断片が固定される。断片の場合は、例えば、約1kbの鎖長が好適に使用できるが、特に限定されるものではなく、該鎖長より短いあるいは長いものであっても検体由来の核酸とハイブリダイゼーションにおいて特異的にハイブリダイズするものであれば、いずれの鎖長でもよい。このような遺伝子としては、特に限定されるものではないが、例えばホルモンレセプター遺伝子、レセプターのコファクターをコードする遺伝子、レセプターからのシグナル伝達に関与するタンパクをコードする遺伝子、ホルモンの生合成もしくは代謝に関与するタンパクをコードする遺伝子、またはオンコジーン等が挙げられる。

また、内分泌かく乱物質の影響によってその発現が変化している遺伝子を含む

核酸試料としては、例えば内分泌かく乱物質に感受性を示す細胞や組織（臓器）に任意の内分泌かく乱物質を接触させた後、経時的あるいは経日的に細胞や組織より調製されるmRNA、もしくは該mRNAを鋳型とした逆転写反応により得られるcDNAを使用することができる。

- 5 内分泌かく乱物質を含んだ試料と接触させる細胞は、生物体から採取したものでも培養細胞でも良い。また、組織は、内分泌かく乱物質によって影響が出ていると思われる部位であれば特に限定はない。さらに使用する細胞、組織もしくは生物体は、特にヒトに限定されるわけではない。内分泌かく乱物質を接触させる時間は、使用する生物体、内分泌かく乱物質およびその影響を受ける遺伝子などに応じて変動し得る。

- 10 一方、対照とする細胞、組織または生物体よりmRNAもしくはそのcDNAを含む核酸試料についても上記と同様に調製し、厳密な条件下でハイブリダイゼーションさせる。核酸試料がDNAアレイ上のDNAとハイブリダイゼーションしているか否かの結果を容易に確認できるように下記のように適当な標識をしておくことができる。

- 15 標識方法としては特に限定されるものではないが、例えば放射性同位元素、蛍光物質、化学発光物質、適当な抗体により認識される抗原等の物質を使用することができる。また、核酸試料を標識することなくハイブリダイゼーションを行い、その後に蛍光、化学発光を発するインターカレーター物質を使用してもよい。

- 20 こうして得られた核酸試料と上記DNAアレイ上のDNAとのハイブリダイゼーションは、公知の方法で実施することができる。ハイブリダイゼーション及び洗浄工程は、DNAアレイ上のDNAの鎖長等に応じて最適な条件で行なうことは当然であるが、例えばモレキュラー クローニング、ア ラボラトリーマニユアル（Molecular cloning, A laboratory manual）、第2版、第9．52～9．55頁（1989）に記載の条件で行なうことができる。

- 25 内分泌かく乱物質を含んだ試料と接触させた細胞、組織または生物体由来の核酸試料と対照の核酸試料とのハイブリダイゼーションの結果を比較することにより、両方でシグナルの強度に有意な差のある遺伝子を検出することができる。具体的には、上記の方法で標識された核酸試料とハイブリダイゼーションを行った

アレイについて放射能、蛍光、発光等のシグナル強度を専用測定器、例えばクロマトスキャナーもしくはイメージアナライザー等を用いて検出することによって、そのシグナル強度の差から当該内分泌かく乱物質の影響により、その発現量が有意に変化する遺伝子を検出することができる。

- 5 また、複数の標識、例えば2種類の蛍光を検出することができる多波長検出蛍光アナライザーを用いれば、内分泌かく乱物質と接触させた細胞、組織または生物体由来の核酸試料と対照の核酸試料との遺伝子発現の差を同じDNAアレイ上で比較することができる。例えば、内分泌かく乱物質と接触させた細胞由来の核酸試料はCy3-dUTPで蛍光標識し、対照の核酸試料はCy5-dUTPで
- 10 蛍光標識する。両者を等量混合してDNAアレイとハイブリダイゼーションを行なうことで両者の遺伝子発現の差を色の違いとして検出することができ、その結果から当該内分泌かく乱物質の影響によりその発現量が有意に変化する遺伝子を検出することができる。

- 15 さらに当該遺伝子は、内分泌かく乱物質を検出するための指標としても有用である。

- 20 内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子の選択は、発現レベルの指標として検出されるシグナル強度を、対照試料由来の核酸試料を用いて得られるものと比較して実施される。例えば、内分泌かく乱物質を含む試料についての蛍光シグナル値を対照試料由来の蛍光シグナル値で割った数値が1.00より大きい場合は、試験物質での処理によってその遺伝子の発現が促進されていることを示し、1.00より小さい場合は、試験物質での処理によってその遺伝子の発現が抑制されていることを示す。また、この数値が1.00の場合は、その遺伝子は試験物質での処理の影響を受けないことを示す。発現が促進される場合、上記値は1.10より大きく、好ましくは1.30より大きく、より好ましくは2.00より大きい。発現が抑制される場合、
- 25 上記値は0.90より小さく、好ましくは0.80より小さく、より好ましくは0.70より小さい。

以上のように本発明の方法によって内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子、例えば細胞の核内レセプター及びそのシグナル伝達経路の下流で関与している多種類の遺伝子の発現を同時にインビトロで迅速、高感度に検出することができる。

また、既知の遺伝子が従来知られていない新しいシグナル伝達経路に関与することを見出すこともできる。

(2) 内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子の発現を指標とした内分泌かく乱物質の検出は、以下の方法により実施することができる。

- 5 上記内分泌かく乱物質の影響を受けていることが確認できた遺伝子について、上記のような方法で固定化したDNAアレイを作製する。

次に内分泌かく乱物質によって影響を受けていると考えられる細胞、組織または生物体より上記のように核酸試料を調製し、上記と同様にハイブリダイズさせて、シグナル強度の差から遺伝子発現の変化を測定することができる。その結果
10 から内分泌かく乱物質の存在を確認することができる。

また、別の態様としては、内分泌かく乱物質の影響を受けていることが確認できた遺伝子のmRNAの競合RNAもしくはDNAを作製し、それを内部標準とした競合RT-PCR法により影響を受けている遺伝子の発現の度合いを定量的に測定することからも内分泌かく乱物質の存在を確認することができる。

- 15 以上のように本発明の方法によって内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子、例えば細胞の核内レセプター及びその下流の多種類の遺伝子の発現を指標にして、内分泌かく乱物質の有無の実質的な判定を容易にすることができる。

(3) 内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質の検出は、以下の方法により実施することができる。

- 20 本明細書において内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質とは、本来、その生体内で営まれている正常なホルモン作用に影響を与える可能性のある物質を意味し、その作用が確認されたものおよびいまだ確認されていないものも含まれる。

内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質の検出のためのDNAアレイは、
25 上記(1)記載の方法で内分泌かく乱物質の影響を受けていることが確認できた遺伝子を上記と同様の方法で固定化して作製する。

次に内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質を含むと予想される試料と接触させた細胞、組織または生物体より上記のように核酸試料を調製し、上記と同様にハイブリダイズさせて、遺伝子発現の変化をシグナル強度差として測定する

ことができる。その結果から該物質は、内分泌かく乱物質と考えることができる。

また、該DNAアレイ上の全DNAにおいてシグナルの変化が確認される場合のみならずその一部のDNAにおいてシグナルの変化が確認される場合においても同様にその結果から該物質は、内分泌かく乱物質と考えることができる。特にその一部のDNAにおいてシグナルの変化が確認される場合には、前述（１）記載の方法で該物質の影響を受ける遺伝子をさらに別を選択することにより検出方法を最適化し、よりの確に該物質の内分泌かく乱を引き起こす物質を検出することができる。

また、別の態様としては、上記のように内分泌かく乱物質の影響を受けていることが確認できた遺伝子のmRNAの競合RNAもしくはDNAを作製し、それを内部標準とした競合RT-PCR法により内分泌かく乱を引き起こす度合いを遺伝子の発現より定量的に検出することもできる。即ち、前述（１）記載の方法で得られた内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子を検出、発現を定量する方法は、特に限定はなく、該遺伝子の検出・定量ができる方法であれば、いずれの方法も好適に使用できる。

（４）本発明のDNAアレイ

本発明のDNAアレイとは、支持体上に遺伝子またはその断片が固定されているものをいい、例えばDNAチップと呼称されているものを包含する。

本発明のDNAアレイに用いる支持体は、ハイブリダイゼーションに使用可能なものであれば特に限定はなく、通常スライドガラス、シリコンチップ、ニトロセルロースやナイロンの膜等が使用される。更に好ましくは、非多孔性で、表面が滑らかな構造を有する材質であれば良く、特に限定はないが、例えばスライドガラス等のガラスが好適に使用できる。支持体の表面は、共有結合または非共有結合によりDNAを固定化できるものであればいずれでもよく、支持体の表面に親水性又は疎水性の官能基を有しているものが好適に使用でき、特に限定はないが、例えば、水酸基、アミノ基、チオール基、アルデヒド基、カルボキシル基、アシル基等を有しているものが好適に使用できる。これらの官能基は、支持体自体の表面特性として存在していてもよいが、表面処理によって導入してもよい。このような表面処理物としては、例えば、ガラスをアミノアルキルシラン等の市

販のシランカップリング剤で処理したものや、ポリリジンやポリエチレンジイミン等のポリ陽イオンで処理したもの等が挙げられる。また、これらの処理を施したスライドガラスの一部は市販されている。

本発明のDNAアレイは、内分泌かく乱物質によって影響を受ける遺伝子あるいは該遺伝子由来のDNA断片が固定されていればよく、該遺伝子あるいは該遺伝子由来のDNA断片が、二本鎖DNAを変性条件において同一支持体に整列固定化されたDNAマイクロアレイでもよく、固定化されたDNAの少なくとも一部が一本鎖DNAであるものも含まれる。また、本明細書のDNAアレイは、二本鎖DNAを変性下において、同一支持体に整列させてスポットしたものでもよい。さらに本発明のDNAアレイにおいて、該アレイの密度について特に限定はないが、例えば、高密度DNAアレイでもよく、100ドット/cm²以上のDNAが固定化されたアレイが好適に使用できる。

本発明において支持体に整列固定化するDNA断片とは特に限定はないが、一般的には鎖長が50塩基以上の二本鎖ポリヌクレオチドまたはその誘導体であつて、PCR (polymerase chain reaction) 法等により、酵素的に増幅して調製されるものを、DNAの固定化支持体への固定化時に変性し、一本鎖DNAまたはその誘導体としたものが好適に使用できる。該誘導体としては、支持体表面への固定化を可能にするような修飾を付されたものであれば良く、特に限定するものではないが、例えばDNAの5'末端にアミノ基やチオール基等の官能基が導入されたDNAが挙げられる。

また、支持体上に固定される遺伝子またはそのDNA断片としては、特に限定するものではないが、例えばゲノムDNAライブラリーあるいはcDNAライブラリーを鋳型としたPCR等によって増幅されたDNAを使用する事ができる。公知のヌクレオチド配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドを使用することも可能である。ハイブリダイゼーションに使用できることが当該分野において公知であるDNA以外の核酸、例えば、インビトロ転写によって調製されたRNAを、DNAの代わりに固定することもできる。上記の遺伝子またはその断片を公知の方法、例えばアミノ基を導入した支持体上に固定することにより該DNAアレイを作製することができる。また、上記固定化の操作をDNAアレイ作製装置、

例えばGMS社製のDNAチップ作製装置を使用して行なうことにより、遺伝子が整列、固定化された本発明のDNAアレイを作製することができる。

本発明で使用するDNAアレイには、ホルモンの作用発現に関連した機能を有するタンパクをコードする遺伝子またはその断片が固定される。断片の場合は、
5 例えば、約100b～約1kbの鎖長が好適に使用できるが、特に限定されるものではなく、該鎖長より短いあるいは長いものであっても検体由来の核酸とハイブリダイゼーションにおいて特異的にハイブリダイズするものであれば、いずれの鎖長でもよい。このような遺伝子としては、特に限定されるものではないが、例えばホルモンレセプター遺伝子、レセプターのコファクターをコードする遺伝子、
10 レセプターからのシグナル伝達に関与するタンパクをコードする遺伝子、ホルモンの生合成もしくは代謝に関与するタンパクをコードする遺伝子、またはオンコジーン等が挙げられる。さらに、例えば、前記(1)記載の方法で得られた内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子を固定化してもよい。さらに、(1)記載の方法で内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子を全て得ることができるため、
15 それらの遺伝子を全て固定化した内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子検出用DNAアレイを作製することができる。

以上のように本発明の方法及び本発明のDNAアレイを用いることによって、例えば細胞の核内レセプター及びそのシグナル伝達経路の下流で関与している遺伝子をインビトロで迅速、高感度で測定できるため、内分泌かく乱を引き起こす
20 可能性のある物質の有無を実質的に容易に判定することができる。

以下に実施例をもってさらに詳細に本発明を説明するが、本発明は実施例の範囲に限定されるものではない。

実施例1

25 内分泌かく乱物質の影響を受ける可能性のある遺伝子を表3に示した。

表 3

因子名 (遺伝子産物)	GenBank登録番号
1. 核内レセプター又は核内レセプター転写共役因子	
p300/CBP	U47741
SRC-1	U40396
N-CoR/SMRT	AF044209/U37146
ACTR	AF036892
RIP140	X84373
TRIP1	L38810
TIF2	X97674
Smad3	AB004924
efp	D21205
lactoferrin	X53961
progesteron receptor	M15716
cathepsin G	J04990
pS2 protein	X52003
prolactin	E02152
ARA70	L49399
vitamin D receptor	J03258
2. キナーゼ型伝達因子	
p38	L35253
p38 gamma	U66243
JNK1	L26318
JNK2	U09759
JNK3	AA992006
ERK1	M76585
BMK α , β , γ	U29725-U29727

因子名 (遺伝子産物)	GenBank登録番号
3. 性腺分化因子	
DAX1	U31929
SOX9	Z46629
WT1	X51630
SRY	L10101
Ad4BP/SF-1	D84206-D84209
EMX2	X68880
4. オンコジーン	
c-Fos	K00650/M16287
c-Myc	J00120/K01908
Bcl-2	M13994-M13995
Bax α, β, γ	L22473-L22475
Bax δ	U19599
Bcl-x	U72398
5. レセプター型キナーゼ	
NGF receptor	M14764
FGF receptor	M34641
VEGF receptor	AF016050
PDGF receptor	M21616
CSF1 receptor	M33208-M33210
EGF receptor	M29366
insulin receptor	M10051

これらの遺伝子のcDNAの3'側非翻訳領域を含む約1kbの断片を、以下のようにして調製した。

すなわち、ヒトおよびマウス由来の細胞および組織mRNA (クローンテック

社製)を鋳型に、それぞれRT-PCR(逆転写-PCR)法により目的のcDNA断片を増幅した。増幅したcDNAの塩基配列分析を行って、目的の断片であることを確認するとともに、エタノール沈殿法により増幅断片を回収し、100 mM 炭酸バッファー(pH 9.5)で1 μ Mとなるように溶解した。この他、
5 ハウスキーピング遺伝子として β -アクチン遺伝子を、また、ネガティブコントロールとしてプラスミドpUC18をそれぞれ同様に調製した。これらをDNAチップ作製装置(GMS社製)を用いてアミノ基導入スライドガラス(シグマ社製)にスポットし、UV照射により固定した。スライドを0.2% SDS、次いで蒸留水で洗浄乾燥してDNAアレイとした。

10

実施例 2

(1) マウスへの投与

10匹の2日齢の雌マウスを、内分泌かく乱物質投与群と非投与群に分け、投与群には内分泌かく乱を引き起こす可能性のあるジェチルスチルベストロール
15 (DES)を0.1 mg/マウス/dayの割合で、2日間静脈注射した。4日目に卵巣を摘出し、mRNA抽出キット(キアゲン社製)を用いてmRNAを調製した。

約3 μ gのmRNA、オリゴdTプライマー、投与群にはCy3-dUTP(アマシャム社製)または非投与群にはCy5-dUTP(アマシャム社製)を含むdNTP、および逆転写酵素(ギブコーBRL社製)を用いてcDNA合成
20 反応を行い、ゲルろ過、次いで減圧濃縮し、4 \times SSC/0.2% SDSに溶解して蛍光標識cDNAを調製した。

(2) 培養細胞の処理

5%ウシ胎児血清(FBS)を含むDME培地で生育させたヒト乳がん細胞MCF-7をトリプシン処理した後、12ウェルの培養プレートに、ウェル当たり2 \times 10⁵の細胞を入れ、同上培地で24時間保持した。培地を除去した後、活性炭-デキストラン処理でステロイドホルモン類を除去したヒト血清を5%含むDME培地で、10 pMの17- β エストラジオールの存在下または非存在下に7
25 2時間培養した。細胞を回収し、実施例2-(1)と同様にmRNAを抽出した。

約3 μ gのmRNA、オリゴdTプライマー、17- β エストラジオール接触細胞の場合はCy3-dUTP、または17- β エストラジオール非接触細胞の場合はCy5-dUTPを含むdNTP、および逆転写酵素（ギブコーBRL社製）を用いてcDNA合成反応を行い、ゲルろ過、次いで減圧濃縮し、4 \times SSC/0.2% SDSに溶解して蛍光標識cDNAを調製した。

(3) 標識cDNAとDNAアレイとのハイブリダイゼーション

(1) で調製したCy3-標識cDNAとCy5-標識cDNAを等量混合し、熱変性した後その5 μ lを実施例1で作製したDNAアレイに滴下し、カバーガラスをかけて周囲をフィルムで密閉した。これを40～45℃で10時間保持した後、カバーガラスを除いて、0.2 \times SSC/0.1% SDS中で30分、次いで0.2 \times SSC中で30分洗浄し、風乾した。これをマイクロアレイスキャナー（GMS社製）にかけて各スポットの蛍光シグナルを解析した。また、(2) で得た標識cDNAについても同様の操作を行った。

その結果、いずれの場合においてもDESを投与したマウスの卵巣および17- β エストラジオールを接触させたMCF-7細胞において、有意なシグナルの変動が見られ、内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子を検出することができた。

実施例3

(1) DNAアレイの作製

実施例1の表3記載の遺伝子から33種類の遺伝子を選択した。その遺伝子を表4に示す。ハウスキーピング遺伝子として β -アクチン遺伝子を、ネガティブコントロールとしてプラスミドpBR322をそれぞれ使用した。

表 4

gene No.	固定化した遺伝子名		使用するPrimerの組み合わせ	
	(遺伝子産物名)		(配列番号)	
5	1.	Smad3	1、	2
	2.	VEGF receptor	3、	4
	3.	ACTR	5、	6
	4.	N-CoR/SMRT	7、	8
	5.	efp	9、	10
10	6.	c-Myc-1	11、	12
	7.	Vitamin D receptor	13、	14
	8.	cathepsin G	市販プライマー	
	9.	c-Myc-2	15、	16
	10.	Bax	17、	18
15	11.	JNK1	19、	20
	12.	p38	21、	22
	13.	TRIP 1	23、	24
	14.	ARA 70	25、	26
	15.	insulin receptor	27、	28
20	16.	NGF receptor	市販プライマー	
	17.	PDGF receptor	29、	30
	18.	CSF1 receptor-1	市販プライマー	
	19.	CSF1 receptor-2	31、	32
	20.	FGF receptor	33、	34
25	21.	p38 gamma	35、	36
	22.	Bcl-X	37、	38
	23.	c-Myc-3	39、	40
	24.	pS2 protein	41、	42
	25.	lactoferrin	43、	44
	26.	RIP 140	45、	46

	27.	TIF2	4 7、4 8
	28.	JNK2	4 9、5 0
	29.	Bax delta	5 1、5 2
	30.	BMK-1	5 3、5 4
5	31.	BMK-2	5 5、5 6
	32.	Src-1	5 7、5 8
	33.	p300/CBP	5 9、6 0
	34.	β -actin (positive control)	6 1、6 2
	35.	pBR 322 (negative control)	

10

これらの遺伝子について実施例 1 記載の方法で表 4 に記載の各プライマー対を使用し、cDNA で約 1 0 0 b ~ 約 1 k b の DNA 断片を調製し、該 DNA 断片をスポットした DNA アレイを作製した。なお、cathepsin G、NGF receptor、CSF1 receptor の各遺伝子については、Human UniGene DNA (リサーチジェネティックス社製) セット中の該遺伝子用プライマーを用いて増幅した。

15

(2) 内分泌かく乱物質の影響の検討

培養細胞に対する各種内分泌かく乱物質の影響を処理時間が 2 時間あるいは 2 4 時間の場合について検討した。

20

2 時間処理の場合：1 0 % ウシ胎児血清 (FBS) を含む DME 培地で生育させたヒト乳がん細胞 MCF-7 をトリプシン処理した後、直径 1 0 c m のデッシュに、デッシュ当り 2×10^6 の細胞を入れ、活性炭-デキストラン処理でステロイドホルモン類を除去したウシ胎児血清を 5 % 含む DME 培地で 2 4 時間培養した。培地を除去した後、1 0 nM の 1 7- β エストラジオール (E_2)、1 0 nM の ジエチルスチルベストロール (DES)、あるいは 5 μ M の ビスフェノール A (BisA) を含む同上培地で 2 時間培養した。また、対照として、前述の化学物質の非存在下のものも同様に調製した。各処理後の細胞を回収し、実施例 2 (1) 記載の方法で全 RNA を抽出した。

25

2 4 時間処理の場合：1 0 % ウシ胎児血清 (FBS) を含む DME 培地で生育

させたヒト乳がん細胞MCF-7をトリプシン処理した後、直径10cmの培養
デッシュに、デッシュ当り 2×10^6 の細胞を入れ、同上培地で24時間保持
した。培地を除去した後、活性炭-デキストラン処理でステロイドホルモン類を
除去したヒト血清を5%含むDME培地で、10nMの17- β エストラジオール
5 (E₂)、10nMのジエチルスチルベストロール(DES)、あるいは5 μ
MのビスフェノールA(BisA)の存在下に24時間培養した。また、対照と
して、前述の化学物質の非存在下のものも同様に調製した。各処理後の細胞を回
収し、実施例2(1)記載の方法で全RNAを抽出した。

(3) (2)で調製した全RNAのDNase処理を行った。上記の全RNA
10 約100~約300 μ g、10 \times AMVバッファ(ライフサイエンス社製)
10 μ l及び10UのDNase I(宝酒造社製)を含む12 μ lの反応液を調
製し、37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートした後、フェノール/クロロホルム抽出
を2回行った後、エタノール沈殿を行った。得られた全RNAの一部を取って濃
度測定を行った。

15 (4) (3)で調製した全RNAを用いて逆転写反応を行った。反応液組成を
以下に示す。

反応液A：上記全RNA約130 μ g、10 μ gのオリゴdTプライマー(宝酒
造社製)及び20 μ lのジエチルピロカーボネート(DEPC、和光純薬社製)
処理水。

20 反応液B：5 \times AMV RTase用緩衝液(ライフサイエンス社製)12 μ
l、各0.5mMのdATP、dCTP、dGTP及び0.2mMのdTTP、
60UのRNaseインヒビター(宝酒造社製)、0.1mMのCy3-標識d
UTP(アマシャムファルマシア社製)。

25 反応液Aを70 $^{\circ}$ Cで10分間保持した後、氷浴上で冷却した。その後、反応液
Bを加え、42 $^{\circ}$ Cで5分間保持した。その後、さらにAMV RTase(ライ
フサイエンス社製)を約60U加え、反応液量をDEPC処理水で60 μ lにし
た。このRT反応液を42 $^{\circ}$ Cで70分間保持した。この反応液に500mMのE
DTA溶液7.5 μ l、1Mの水酸化ナトリウム15 μ lを加え、60 $^{\circ}$ Cで
1時間保持し、鋳型RNAを分解させた。室温まで冷却した後、1Mのトリス-

塩酸 (pH 7.5) を $37.5 \mu\text{l}$ 添加した。この溶液をマイクロコン YM-30 (ミリポア社製) で $20 \mu\text{l}$ まで濃縮し、1 mM の EDTA を含む 10 mM の トリス-塩酸を $200 \mu\text{l}$ 加えた後、再度 $20 \mu\text{l}$ まで濃縮した。この Cy3-標識 cDNA 溶液を以降のハイブリダイズに使用した。

- 5 (5) (4) で調製した Cy3-標識 cDNA を熱変性した後、全量を (1) で調製した DNA アレイに滴下し、カバーガラスをかけて周囲をフィルムで密閉した。これを $40 \sim 45^\circ\text{C}$ で 10 時間保持した後、カバーガラスを除いて、 $0.2 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS}$ 中で 30 分、次いで $0.2 \times \text{SSC}$ 中で 30 分洗浄し、風乾した。これをマイクロアレイスキャナー (GMS 社製) にかけて各スポットの蛍光シグナルを解析した。各物質処理後試料の蛍光シグナル値を対照の
- 10 蛍光シグナル値で割った結果のうち代表的なものを表 5 に示す。表 5 において、数値が 1.00 より大きい場合は、各物質処理によってその遺伝子の発現が促進されていることを示し、1.00 より小さい場合は、各物質処理によってその遺伝子の発現が抑制されていることを示す。また、数値が 1.00 の場合は、その遺伝子は各物質
- 15 処理の影響を受けないことを示す。

表 5

	固定化した遺伝子名 (遺伝子産物名)	D E S 処理 2hr / 24hr	B i s A 処理 2hr / 24hr	E ₂ 処理 2hr / 24hr
核内レセプター又は核内レセプター転写共役因子				
5	p300/CBP	1.28 / 4.45	1.50 / 1.07	1.67 / 3.39
	N-CoR/SMRT	0.62 / 1.42	1.17 / 1.08	1.86 / 1.51
	ACTR	1.14 / 4.97	0.47 / 1.03	1.19 / 3.27
	RIP 140	1.74 / 2.51	1.70 / 1.14	1.46 / 2.34
	TIF2	1.19 / 3.04	2.66 / 0.84	2.17 / 3.30
10	ARA 70	0.63 / 1.37	1.31 / 0.93	1.47 / 1.45
キナーゼ型伝達因子				
	JNK2	0.72 / 1.85	1.30 / 0.71	1.86 / 1.71
	BMK-2	1.15 / 6.06	1.04 / 0.29	1.13 / 0.05
オンコジーン				
15	c-Myc-1	1.08 / 0.00	1.40 / 1.30	2.52 / 1.89
	Bax	1.34 / 2.27	2.41 / 1.44	1.32 / 0.99
レセプター型キナーゼ				
	PDGF receptor	0.65 / 3.04	1.25 / 1.19	1.63 / 2.89
	VEGF receptor	1.15 / 3.27	0.37 / 0.46	2.13 / 2.94

20

25

内分泌かく乱作用によってかく乱された結果起ったと考えられている野生動物の生殖以上やヒトにおける精子形成の低下などは、内分泌作用のシグナルがある段階で抑制あるいは停止されたものと考えられる場合が多い。よって、コントロールの細胞と比較して過剰発現している遺伝子以外に抑制されている遺伝子にも注目すべきであると考え。例えば、本実施例に用いた遺伝子のうち、表 5 に示したように、E₂ の刺激に対してパスウェイあるいはメカニズム等においては不明な部分も多いが、エストロゲン作用に関係の深い遺伝子と考えられる多くの遺伝子が影響を受けて、発現促進されていることが確認できた（例えば、p 3 0 0

／CBP、ACTR、RIP 140、TIF2、PDGFレセプター、VEGFレセプターの遺伝子)。また、内分泌かく乱作用を起こさせるDESによる刺激に対しては、24時間培養処理の場合では、c-Mycを除くほぼすべての遺伝子が活性化されているが、2時間培養処理の場合において、核内レセプター又は核内レセプター転写共役因子のN-COR/SMRTやARA 70、キナーゼ型伝達因子のp38 gamma (データは示さず)、JNK2、レセプター型キナーゼのPDGFレセプターなどの遺伝子発現が抑制されていることが確認できた。一方、内分泌かく乱作用を疑われているBisAによる刺激に対しては、2時間培養処理の場合、発現抑制を受けている遺伝子は、核内レセプター又は核内レセプター転写共役因子のうちACTR遺伝子、レセプター型キナーゼのうちVEGFレセプター遺伝子があり、DES刺激の場合に比較して遺伝子への影響が少ないと考えられた。しかしながら、24時間培養処理の場合においては、キナーゼ型伝達因子であるJNK2、BMK2、レセプター型キナーゼであるVEGFレセプターなどの遺伝子が発現抑制を受けており、DES刺激とは異なったパターンで遺伝子の発現制御が起こっていることが確認できた。このように本発明のチップを用いることにより、処理物質及び処理時間ごとに発現の有意なシグナルの変動を観察する方法が提供され、内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子、特に発現が抑制される遺伝子を明確にを検出することができた。

20 産業上の利用の可能性

以上のように本発明の方法によって内分泌かく乱物質の影響を受ける多種類の遺伝子を同時にインビトロで迅速、高感度に検出できるという優れた効果を奏する。また本発明は、迅速、高感度に内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子を検出することができるDNAアレイを提供する。また、従来知られていない新しいシグナル伝達経路に関与する遺伝子の検出方法としても有用である。さらに本発明の方法によって得られた内分泌かく乱物質の影響を受ける多種類の遺伝子の発現を指標にして、内分泌かく乱物質もしくは内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質の有無を判定することができるという優れた効果を奏する。

配列表フリーテキスト

SEQ ID NO:1: Designed oligonucleotide primer to amplify Smad3 mRNA.

5 SEQ ID NO:2: Designed oligonucleotide primer to amplify Smad3 mRNA.

SEQ ID NO:3: Designed oligonucleotide primer to amplify VEGF receptor mRNA.

SEQ ID NO:4: Designed oligonucleotide primer to amplify VEGF receptor mRNA.

10 SEQ ID NO:5: Designed oligonucleotide primer to amplify ACTR mRNA.

SEQ ID NO:6: Designed oligonucleotide primer to amplify ACTR mRNA.

15 SEQ ID NO:7: Designed oligonucleotide primer to amplify N-CoR/SMRT mRNA.

SEQ ID NO:8: Designed oligonucleotide primer to amplify N-CoR/SMRT mRNA.

SEQ ID NO:9: Designed oligonucleotide primer to amplify efp mRNA.

20 SEQ ID NO:10: Designed oligonucleotide primer to amplify efp mRNA.

SEQ ID NO:11: Designed oligonucleotide primer to amplify c-Myc-1 mRNA.

25 SEQ ID NO:12: Designed oligonucleotide primer to amplify c-Myc-1 mRNA.

SEQ ID NO:13: Designed oligonucleotide primer to amplify vitamin D receptor mRNA.

SEQ ID NO:14: Designed oligonucleotide primer to amplify vitamin D receptor mRNA.

SEQ ID NO:15: Designed oligonucleotide primer to amplify c-Myc-
2 mRNA.

SEQ ID NO:16: Designed oligonucleotide primer to amplify c-Myc-
2 mRNA.

5 SEQ ID NO:17: Designed oligonucleotide primer to amplify Bax
mRNA.

SEQ ID NO:18: Designed oligonucleotide primer to amplify Bax
mRNA.

10 SEQ ID NO:19: Designed oligonucleotide primer to amplify JNK1
mRNA.

SEQ ID NO:20: Designed oligonucleotide primer to amplify JNK1
mRNA.

SEQ ID NO:21: Designed oligonucleotide primer to amplify p38
mRNA.

15 SEQ ID NO:22: Designed oligonucleotide primer to amplify p38
mRNA.

SEQ ID NO:23: Designed oligonucleotide primer to amplify TRIP 1
mRNA.

20 SEQ ID NO:24: Designed oligonucleotide primer to amplify TRIP 1
mRNA.

SEQ ID NO:25: Designed oligonucleotide primer to amplify ARA 70
mRNA.

SEQ ID NO:26: Designed oligonucleotide primer to amplify ARA 70
mRNA.

25 SEQ ID NO:27: Designed oligonucleotide primer to amplify
insulin receptor mRNA.

SEQ ID NO:28: Designed oligonucleotide primer to amplify
insulin receptor mRNA.

SEQ ID NO:29: Designed oligonucleotide primer to amplify PDGF

receptor mRNA.

SEQ ID NO:30: Designed oligonucleotide primer to amplify PDGF
receptor mRNA.

5 SEQ ID NO:31: Designed oligonucleotide primer to amplify CSF1
receptor-2 mRNA.

SEQ ID NO:32: Designed oligonucleotide primer to amplify CSF1
receptor-2 mRNA.

SEQ ID NO:33: Designed oligonucleotide primer to amplify FGF
receptor mRNA.

10 SEQ ID NO:34: Designed oligonucleotide primer to amplify FGF
receptor mRNA.

SEQ ID NO:35: Designed oligonucleotide primer to amplify p38
gamma mRNA.

15 SEQ ID NO:36: Designed oligonucleotide primer to amplify p38
gamma mRNA.

SEQ ID NO:37: Designed oligonucleotide primer to amplify Bcl-X
mRNA.

SEQ ID NO:38: Designed oligonucleotide primer to amplify Bcl-X
mRNA.

20 SEQ ID NO:39: Designed oligonucleotide primer to amplify c-Myc-
3 mRNA.

SEQ ID NO:40: Designed oligonucleotide primer to amplify c-Myc-
3 mRNA.

25 SEQ ID NO:41: Designed oligonucleotide primer to amplify pS2
protein mRNA.

SEQ ID NO:42: Designed oligonucleotide primer to amplify pS2
protein mRNA.

SEQ ID NO:43: Designed oligonucleotide primer to amplify
lactoferrin mRNA.

SEQ ID NO:44: Designed oligonucleotide primer to amplify lactoferrin mRNA.

SEQ ID NO:45: Designed oligonucleotide primer to amplify RIP 140 mRNA.

5 SEQ ID NO:46: Designed oligonucleotide primer to amplify RIP 140 mRNA.

SEQ ID NO:47: Designed oligonucleotide primer to amplify TIF2 mRNA.

10 SEQ ID NO:48: Designed oligonucleotide primer to amplify TIF2 mRNA.

SEQ ID NO:49: Designed oligonucleotide primer to amplify JNK2 mRNA.

SEQ ID NO:50: Designed oligonucleotide primer to amplify JNK2 mRNA.

15 SEQ ID NO:51: Designed oligonucleotide primer to amplify Bax delta mRNA.

SEQ ID NO:52: Designed oligonucleotide primer to amplify Bax delta mRNA.

20 SEQ ID NO:53: Designed oligonucleotide primer to amplify BMK-1 mRNA.

SEQ ID NO:54: Designed oligonucleotide primer to amplify BMK-1 mRNA.

SEQ ID NO:55: Designed oligonucleotide primer to amplify BMK-2 mRNA.

25 SEQ ID NO:56: Designed oligonucleotide primer to amplify BMK-2 mRNA.

SEQ ID NO:57: Designed oligonucleotide primer to amplify Src-1 mRNA.

SEQ ID NO:58: Designed oligonucleotide primer to amplify Src-1

mRNA.

SEQ ID NO:59: Designed oligonucleotide primer to amplify
p300/CBP mRNA.

5 SEQ ID NO:60: Designed oligonucleotide primer to amplify
p300/CBP mRNA.

SEQ ID NO:61: Designed oligonucleotide primer to amplify β -
actin mRNA.

SEQ ID NO:62: Designed oligonucleotide primer to amplify β -
actin mRNA.

10

請 求 の 範 囲

1. 内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子を検出する方法であって、内分泌かく乱物質を含む試料と接触させた細胞、組織または生物体由来のmRNAまたはそのcDNAを含む核酸試料を調製し、該核酸試料を内分泌かく乱物質の影響を受ける可能性のある遺伝子もしくは該遺伝子由来のDNA断片が固定されたDNAアレイとハイブリダイズさせ、その結果を対照試料由来の核酸試料を用いたものと比較して内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子を選択することを特徴とする遺伝子の検出方法。

2. 下記遺伝子群から選択される遺伝子もしくは該遺伝子由来のDNA断片を使用する請求項1記載の遺伝子の検出方法：

- (1) 核内レセプター又は核内レセプター転写共役に関与する遺伝子群、
- (2) キナーゼ型伝達に関与する遺伝子群、
- (3) 性腺分化に関与する遺伝子群、
- (4) レセプター型キナーゼに関与する遺伝子群、
- (5) 中間フィラメントマーカに関与する遺伝子群、
- (6) 細胞周期、成長調節に関与する遺伝子群、
- (7) オンコジーン及び腫瘍抑制に関与する遺伝子群、
- (8) アポトーシスに関与する遺伝子群、
- (9) DNA損傷反応、修復、再構成に関与する遺伝子群、
- (10) レセプターに関与する遺伝子群、
- (11) 細胞死及び分化調節に関与する遺伝子群、
- (12) 細胞接着、運動性及び浸潤に関与する遺伝子群、
- (13) 血管新生促進に関与する遺伝子群、
- (14) 細胞浸潤に関与する遺伝子群、
- (15) 細胞間相互作用に関与する遺伝子群、
- (16) Rhoファミリー GTPase及びその調節因子に関与する遺伝子群、又は
- (17) 成長因子及びサイトカインに関与する遺伝子群。

3. 請求項 1 または請求項 2 記載の方法により検出された遺伝子の発現を測定することを特徴とする内分泌かく乱物質の検出方法。

4. 内分泌かく乱物質が下記の分類から選択されることを特徴とする請求項 3 記載の内分泌かく乱物質の検出方法：

- 5 (1) ダイオキシン類、
- (2) 有機塩素系化合物類、
- (3) フェノール類、
- (4) フタル酸エステル類、
- (5) 芳香族炭化水素類、
- 10 (6) 農薬類、
- (7) 有機スズ化合物、
- (8) エストロゲン類、又は
- (9) マイレックス、トキサフェン、アルディカーブ又はキーボン。

5. 内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質を検出する方法であって、
15 当該物質が含まれると予想される試料と接触させた細胞、組織または生物体由来の mRNA またはその cDNA を含む核酸試料を調製し、該核酸試料を内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子もしくは該遺伝子由来の DNA 断片が固定された DNA アレイとハイブリダイズさせ、その結果を対照試料由来の核酸試料を用いたものと比較して、内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質を検出すること
20 を特徴とする検出方法。

6. 内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質が下記の分類に属すること
特徴とする請求項 5 記載の内分泌かく乱物質の検出方法：

- (1) ダイオキシン類、
- (2) 有機塩素系化合物類、
- 25 (3) フェノール類、
- (4) フタル酸エステル類、
- (5) 芳香族炭化水素類、
- (6) 農薬類、
- (7) 有機スズ化合物、

(8) エストロゲン類、又は

(9) マイレックス、トキサフェン、アルディカーブ又はキーボン。

7. 内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子もしくは内分泌かく乱物質の影響を受ける可能性のある遺伝子または該遺伝子由来のDNA断片が固定されていることを特徴とする内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子検出用DNAアレイ。

8. 下記遺伝子群から選択される遺伝子あるいは該遺伝子由来のDNA断片が固定されていることを特徴とする請求項7記載のDNAアレイ：

- (1) 核内レセプター又は核内レセプター転写共役に関与する遺伝子群、
- (2) キナーゼ型伝達に関与する遺伝子群、
- (3) 性腺分化に関与する遺伝子群、
- (4) レセプター型キナーゼに関与する遺伝子群、
- (5) 中間フィラメントマーカーに関与する遺伝子群、
- (6) 細胞周期、成長調節に関与する遺伝子群、
- (7) オンコジーン及び腫瘍抑制に関与する遺伝子群、
- (8) アポトーシスに関与する遺伝子群、
- (9) DNA損傷反応、修復、再構成に関与する遺伝子群、
- (10) レセプターに関与する遺伝子群、
- (11) 細胞死及び分化調節に関与する遺伝子群、
- (13) 細胞接着、運動性及び浸潤に関与する遺伝子群、
- (14) 血管新生促進に関与する遺伝子群、
- (15) 細胞浸潤に関与する遺伝子群、
- (16) 細胞間相互作用に関与する遺伝子群、
- (17) R h oファミリー G T P a s e 及びその調節因子に関与する遺伝子群、又は
- (18) 成長因子及びサイトカインに関与する遺伝子群。

9. 遺伝子もしくは該遺伝子由来のDNA断片がスライドガラスに固定されていることを特徴とする請求項7又は請求項8記載のDNAアレイ。

SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo co., Ltd.

<120> Method of detecting a gene which is influenced by an environmental
endocrine

<130> 661516

<150> JP 10-310285

<151> 1998-10-30

<160> 62

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify Smad3 mRNA.

<400> 1

caggtgtccc atcggaagg

19

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify Smad3 mRNA.

<400> 2

ctctctggta gtggtaggga tt

22

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify VEGF receptor mRNA.

<400> 3

tacaagatcg acgttagctc

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify VEGF receptor mRNA.

<400> 4

cagccaaatt cacagttaaa

20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 /24

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify ACTR mRNA.

<400> 5

gctttgaaga tataatccga aggt

24

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify ACTR mRNA.

<400> 6

ggcctggtga tgacagagta gataa

25

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify N-CoR/SMRT mRNA.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 7

tatggaggac cctatgaaag tgta

24

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify N-CoR/SMRT mRNA.

<400> 8

ttacgaccat gttctactag acctt

25

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify efp mRNA.

<400> 9

cgccgtgaag acgtgcttgg

20

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify efp mRNA.

<400> 10

tcttggtcag gctctgttca atctc

25

<210> 11

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify c-Myc-1 mRNA.

<400> 11

cgccaagctc gtctca

16

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify c-Myc-1 mRNA.

<400> 12

tcaactgttc tcgtcgtttc

20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify vitamin D receptor mRNA.

<400> 13

caaacgctgt gtggacatcg g

21

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify vitamin D receptor mRNA.

<400> 14

ttctggatca tcttggcata gag

23

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7 /24

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify c-Myc-2 mRNA.

<400> 15

gtagtaattc cagcgagagg

20

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify c-Myc-2 mRNA.

<400> 16

ctatgggcaa agtttcgtg

19

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify Bax mRNA.

<400> 17

tgttttctga cggcaacttc

20

<210> 18

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify Bax mRNA.

<400> 18

gagcactccc gccacaa

17

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify JNK1 mRNA.

<400> 19

gagcagaagc aagcgtgac

19

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify JNK1 mRNA.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9 /24

<400> 20

gacattgatg tacgggtgtt

20

<210> 21

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify p38 mRNA.

<400> 21

gtgcccgagc gttacca

17

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify p38 mRNA.

<400> 22

aaagttcatc ttcggcatct

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/24

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify TRIP 1 mRNA.

<400> 23

aaatgctaaa gttgcctat

20

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify TRIP 1 mRNA.

<400> 24

acatggactc gccgttct

18

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify ARA 70 mRNA.

<400> 25

agttgcataa gccgtcac

18

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11/24

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify ARA 70 mRNA.

<400> 26

actagccaat ctgataggtc

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify insulin receptor mRNA.

<400> 27

gctgccacca atacgtcatt

20

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify insulin receptor mRNA.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12/24

<400> 28

gcatcctgcc catcgaact

19

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify PDGF receptor mRNA.

<400> 29

tcaccattcc atgccgagta acaga

25

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify PDGF receptor mRNA.

<400> 30

aggacagtgg gcggtgggta gg

22

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

13/24

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify CSF1 receptor-2 mRNA.

<400> 31

ccaccctgaa tgaagtcaac

20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify CSF1 receptor-2 mRNA.

<400> 32

ggtggatgga ttaagactga

20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify FGF receptor mRNA.

<400> 33

cagactccgg cctctatgct

20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify FGF receptor mRNA.

<400> 34

gggcttccag aacggtcaac

20

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify p38 gamma mRNA.

<400> 35

tgatcgggct gctggacgta ttc

23

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

15/24

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify p38 gamma mRNA.

<400> 36

agagggccttg cattggtcag gatag

25

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify Bcl-X mRNA.

<400> 37

ccgggagctg gtggttgact tt

22

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify Bcl-X mRNA.

<400> 38

ttcttaccca gccgccgttc t

21

<210> 39

<211> 20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

16/24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify c-Myc-3 mRNA.

<400> 39

gtagtaattc cagcgagagg

20

<210> 40

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify c-Myc-3 mRNA.

<400> 40

ctatgggcaa agtttcgtg

19

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify pS2 protein mRNA.

<400> 41

THIS PAGE BLANK (USPTO)

17/24

ggcccagaca gagacgtgta

20

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify pS2 protein mRNA.

<400> 42

gctcgatggt attaggatag aa

22

<210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify lactoferrin mRNA.

<400> 43

ggagctgctgc aagtgtaac

19

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

18/24

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify lactoferrin mRNA.

<400> 44

attagtaatg cctgcgacat

20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify RIP 140 mRNA.

<400> 45

gcctctttgc ttcagtcatt

20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify RIP 140 mRNA.

<400> 46

ttggcttagg tatagtctgg

20

<210> 47

THIS PAGE BLANK (USPTO)

19/24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify TIF2 mRNA.

<400> 47

tccaaggcaa gatcacgtct

20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify TIF2 mRNA.

<400> 48

aagccaacga tgacccta

20

<210> 49

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify JNK2 mRNA.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

20/24

<400> 49

tatagtgtcc aagtggcaga ctcaa

25

<210> 50

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify JNK2 mRNA.

<400> 50

atgtatgggt gacgcagagc ttc

23

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify Bax delta mRNA.

<400> 51

gatgattgcc gccgtggaca caga

24

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

21/24

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify Bax delta mRNA.

<400> 52

ggtgagcact cccgccacaa agatg

25

<210> 53

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify BMK-1 mRNA.

<400> 53

ttaaagcccg ctccttcgat gtgac

25

<210> 54

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify BMK-1 mRNA.

<400> 54

ggcggtcggc acctgggtac act

23

THIS PAGE BLANK (USPTO)

22/24

<210> 55

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify BMK-2 mRNA.

<400> 55

ggtggccatc aagaagatcc ctaat

25

<210> 56

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify BMK-2 mRNA.

<400> 56

cctcacgcct tgcattggaag tcct

24

<210> 57

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify Src-1 mRNA.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 57

gtatgaatga aggacccaat aactc

25

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify Src-1 mRNA.

<400> 58

ctggcaggat ctccgatttg a

21

<210> 59

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify p300/CBP mRNA.

<400> 59

ttcagtcacc aacgtgccaa atatg

25

<210> 60

<211> 23

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

24/24

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify p300/CBP mRNA.

<400> 60

ttagagctgc gggatcaggt gtt

23

<210> 61

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify β -actin mRNA.

<400> 61

caagagatgg ccacggctgc t

21

<210> 62

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify β -actin mRNA.

<400> 62

tccttctgca tcctgtcggc a

21

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05964

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/12, C12M1/00, G01N33/566, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/12, C12M1/00, G01N33/566, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEW, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, 5445934, A (Affymax Technologies N.V.), 08 October, 1992 (08.10.92) & JP, 4-505763, A & EP, 476014, A	1-9
Y	Amy Hoffer et al., "Dioxin Induces Transcription of fos and jun Genes by Ah Receptor-Dependent and -Independent Pathways" Toxicology and Applied Pharmacology (1996), Vol. 141, p. 238-247	1-9
Y	Fujio Kayama, "What is the environmental hormone problem?" (in Japanese), Chemistry, Vol. 53, July 1998, p. 12-15	1-9
A	US, 5496703, A (Cornell Research Foundation Inc.), 23 February, 1995 (23.02.95) & JP, 7-501883, A & EP, 614530, A	1-9
A	US, 4798807, A (The Regents of the University of California), 21 January, 1988 (21.01.88) & JP, 63-014691, A & EP, 251635, A	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 January, 2000 (25.01.00)Date of mailing of the international search report
15 February, 2000 (15.02.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/05964

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/12, C12M1/00, G01N33/566, G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/12, C12M1/00, G01N33/566, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEW, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	US, 5445934, A (アフィマックス テクノロジー ナームロゼ ベノ ートスハツブ) 8.10月.1992(08.10.92) & JP, 4-505763, A & EP, 476014, A	1-9
Y	Amy Hoffer et al. "Dioxin Induces Transcription of fos and jun Genes by Ah Receptor-Dependent and -Independent Pathways " Toxicology and Applied Pharmacology (1996) 第141巻 p. 238-247	1-9
Y	香山不二雄著 「環境ホルモン問題とは何か」 化学, 第53巻 (7月.1998) p. 12-15	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.01.00

国際調査報告の発送日

15.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤 浩

4B

9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US, 5496703, A (コーネル リサーチ ファウンデーション インコ ーポレイテッド) 23. 2月. 1995 (23. 02. 95) & JP, 7-501883, A & EP, 614530, A	1-9
A	US, 4798807, A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オ ブ カリフォルニア) 21. 1月. 1988 (21. 01. 88) & JP, 63-014691, A & EP, 251635, A	1-9